



Departamento de Farmacología y Terapéutica
Instituto-Fundación Teófilo Hernando de I+D del Medicamento
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid

**Diseño, síntesis y evaluación farmacológica de
nuevos análogos de ácido okadaico con diana
en la proteína fosfatasa 2A: interés en
cáncer de pulmón y enfermedad de Alzheimer**

Memoria presentada por

Raquel López Arribas

para optar al Grado de Doctor con mención "Doctor Internacional"

Directores

Dr. Cristóbal de los Ríos Salgado

Dra. Carmen Montiel López

Madrid, 2020



Departamento de Farmacología y Terapéutica

Facultad de Medicina

Universidad Autónoma de Madrid

El Dr. CRISTÓBAL DE LOS RÍOS SALGADO, Investigador Postdoctoral “Miguel Servet II” del Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Universitario de La Princesa, y la Profa. CARMEN MONTIEL LÓPEZ, Catedrática del Departamento de Farmacología y Terapéutica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid,

CERTIFICAN

que, Doña RAQUEL LÓPEZ ARRIBAS ha realizado bajo su dirección el trabajo de investigación **“Diseño, síntesis y evaluación farmacológica de nuevos análogos de ácido okadaico con diana en la proteína fosfatasa 2A: interés en cáncer de pulmón y enfermedad de Alzheimer”**, con objeto de obtener el Grado de Doctor con mención “Doctor Internacional” por la Universidad Autónoma de Madrid.

Para que conste a los efectos oportunos, expiden y firman la presente en Madrid, a 2 de septiembre de 2020.

Dr. Cristóbal de los Ríos Salgado
Investigador Postdoctoral Miguel Servet II

Profa. Carmen Montiel López
Catedrática de Farmacología

A mis padres.

A Bea, Rober y Adrián.

A Alberto.

AGRADECIMIENTOS

Nadie dijo que hacer una Tesis fuera una tarea fácil, pero, gracias a muchas de las personas que me han acompañado en esta aventura, ha merecido enormemente la pena. Estas líneas son para intentar agradecerles a todos ellos su inolvidable ayuda.

En primer lugar, me gustaría reconocer la confianza que han depositado en mí mis directores de Tesis. A la Profa. Carmen Montiel, gracias por acogerme en tu laboratorio a pesar del reto que suponía embarcarse en un proyecto tan diferente como el que yo le presentaba. Gracias por enseñarme lo que es hacer buena farmacología. Al Dr. Cristóbal de los Ríos, por creer ciegamente en mí desde el primer hasta el último día. Gracias por ayudarme a desarrollar un espíritu crítico y por no abandonar mi investigación cuando tenías una batalla más importante entre manos. Si se cree y se trabaja, se puede.

A la Universidad Autónoma de Madrid, por brindarme los medios económicos necesarios para poder realizar esta Tesis. Al Instituto-Fundación Teófilo Hernando de I+D del Medicamento, en especial al Prof. Antonio G. García, por involucrarme en tantos Seminarios, Simposios y Congresos nacionales e internacionales que me han permitido crecer enormemente como científica.

En especial, mi total agradecimiento a mi compañera de laboratorio Rocío Lajarín. La gran acogida que tuve al llegar al laboratorio y tu exquisito modo de trabajar han sido esenciales en mi formación. Gracias por ser mi ejemplo durante estos años.

Al resto de compañeras del L8, gracias por convertirnos en mis amigas. No me imagino esta etapa sin la alegría y energía arrolladora de Sheila. Gracias por la incalculable ayuda que me has ofrecido cuando pensaba que la síntesis iba a poder conmigo (¡y a los complucompis!) y, en definitiva, como diría la canción, gracias por todas esas cosas que no se pueden contar. A Paloma, por su pasión por la química y por ser mi pampamiga. A ti el riesgo no es lo que te asusta, así que suerte para lo que te queda de Tesis. Y como no, a Lucía. Gracias de corazón por estos años compartiendo tantas horas trabajando en cultivos, cantando en el despacho o viajando por medio mundo. Aunque no haya podido ayudarte tanto como me hubiera gustado en tu Tesis, siempre podrás contar conmigo. Hemos sido un buen equipo.

A mi familia del L2, por enseñarme tantas técnicas nuevas trabajando con tanta pulcritud. A Anna, por tantas horas discutiendo de PP2A, cisplatino y nicotina, pero sobre todo por todos los buenos ratos fuera del labo. A José Luis, gracias padre por los abrazos, por tener siempre una frase de ánimo y por las buenas cervezas compartidas. A María, la pequeña gran

revolución del laboratorio, por esa actitud tan alegre. A ti no hay western ni nada en el mundo que te frene. A Carol y Gema, por ayudarme en mis primeros días en el L2.

A todos los amigos que he tenido la suerte de conocer durante esta época. A Guille, fue mágico coincidir contigo en el Máster y vivir tantos buenos momentos juntos. A Michelle, mi cortador de rodajas favorito. A Iago, gracias por las conversaciones infinitas de absolutamente cualquier tema. Viveiro y la ciencia tienen en ti el mejor embajador posible. A Diego, por aguantarme tantos años y enseñarme tanta cultura canaria. Hemos hecho de las comidas grandes momentos de risas y confesiones. Con Irene, seguro que nos esperan muchas cenas y disfraces. A Martín, mil gracias por enseñarme tanto. Conocerte supuso un antes y un después en mi Tesis. A Clara, por contagiar su valentía. A la Dra. Eva M^a García, por la ayuda con la cristalización y sobre todo por ser la mejor fotógrafa de congresos. A Mercedes Villarroja, por tener siempre unas palabras amables.

Al resto de compañeros del Departamento. A Jonal, Inés, Isa, Ander, Luis y Ricardo, por los consejos cuando estaba empezando. Francesco, gracias por ser mi héroe en aquel accidente de laboratorio. Buena suerte para el resto de tu Tesis. Pablo y Kike, gracias por aguantar mis charlas sobre el reciclaje. Ánimo para lo que os queda. A los compis del L5, por compartir consejos, reactivos y risas.

A todos los estudiantes que han formado parte de nuestro grupo. Ayudaros en vuestros proyectos ha sido realmente gratificante. En especial a Dorleta, aún me río al recordar nuestra aventura con el frigorífico. A Manu, farmacéutico, fuenlabreño y del Atleti, cómo no te iba a querer. A María, dirigir tu TFG ha sido uno de los mayores retos de esta etapa. Suerte para el camino que ahora empiezas tú.

To my PP2A friends in Leuven, Judit, Saar, Célie, Lisa, Liesbeth, Michiel, Bob and Maria. I really appreciate everything I learned from you. Judit, you also introduced me to the Belgian culture. Our La Chouffe times are one of the best memories of my short stay. Specially, thank you Prof. Veerle Janssens for giving me the opportunity to be part of your amazing lab. You are the kind of scientist I would like to be in the future.

A mis amigas, Iris, Silvia, Carmen y Cristina. Por el apoyo psicológico durante estos años y toda la vida. Por entender que a veces los fines de semana tenía que ir a “cuidar de las neuronas”, por todas las risas y por hacer mi vida tan feliz. A Sandra, mi farmacéutica favorita. Juntas era más fácil estudiar Orgánica, Farmacología o hasta Edafología. A Edgar, por volver a aparecer en mi vida para ser mi “coach”. A David, por la confianza en mí desde mucho antes de Ra16.

Me gustaría agradecer enormemente a mis padres su apoyo incondicional. Sin vosotros todo esto simplemente no hubiera sido posible. A Bea y Rober, por todas las veces que habéis intentado entender qué era eso de PP2A y por todas las palabras de ánimo. A Adrián, por borrarle todas las preocupaciones con solo una mirada. A Poli y Marian, os he sentido cerca hasta cuando estaba de estancia. A Germán, por creer siempre en nosotras. Fuiste mi ejemplo para empezar esta aventura con viento de cara. Esta Tesis es para ti.

Alberto, no hay páginas suficientes para agradecerte todo lo que haces por mí. Por celebrar más que yo mis pequeñas victorias y por empujarme a seguir hacia delante en los peores momentos. Gracias, hasta la luna, por ser como eres y por hacerme feliz.

*Las preguntas que no podemos contestar son las que más
nos enseñan. Nos enseñan a pensar. Si le das a alguien
una respuesta, lo único que obtiene es cierta
información. Pero si le das una pregunta, él buscará sus
propias respuestas.*

...

*Así, cuanto más difícil es la pregunta, más difícil será la
búsqueda. Cuanto más difícil es la búsqueda, más
aprendemos.*

Patrick Rothfuss
El temor de un hombre sabio

ABREVIATURAS

ACh	Acetilcolina
Act.	Actividad
AD	Adenocarcinoma de pulmón
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Akt	Serina/treonina cinasa B
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilisoxazol-4-propiónico
Anal. Elemen.	Análisis elemental
AO	Ácido okadaico
APP	Proteína precursora de amiloide (del inglés <i>amyloid precursor protein</i>)
Ar	Aromático
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosín trifosfato
BACE-1	Enzima β -secretasa (del inglés <i>beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1</i>)
bd	Doblete ancho (del inglés <i>broad doublet</i>)
bdd	Doble doblete ancho (del inglés <i>broad doublet of doublets</i>)
BHE	Barrera hematoencefálica
bs	Singlete ancho (del inglés <i>broad singlet</i>)
BSA	Albúmina de suero bovino
bt	Triplete ancho (del inglés <i>broad triplet</i>)
c	Concentración de la disolución (cálculo de la rotación óptica)
Cdk5	Proteína cinasa dependiente de ciclina 5 (del inglés <i>cyclin-dependent kinase 5</i>)
calc.	Calculado
CI₅₀	Concentración inhibitoria 50
CIP2A	Oncoproteína cancerosa inhibidora de PP2A (del inglés <i>oncoprotein cancerous inhibitor of PP2A</i>)
clogP	Logaritmo de P calculado
Cn	Calcineurina
col.	Colaboradores
Comp	Compuestos
CRT1	Transportador de cobre 1 (del inglés <i>Cooper transporter 1</i>)
d	Doblete
dd	Doble doblete

ddd	Doble doblete de dobletes
dm	Doble multiplete
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco (del inglés <i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>)
DMP	Peryodinano de Dess-Martin
DMSO	Dimetilsulfóxido
dt	Doble triplete
EA	Enfermedad de Alzheimer
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico (del inglés <i>epidermal growth factor</i>)
EHT	<i>N</i> -eicosanoilserotonina
EMAR	Espectrometría de masas de alta resolución
EMEM	Medio esencial mínimo de Eagle (del inglés <i>Eagle's minimum essential medium</i>)
Eq	Equivalente
ESG	Etoxisanguinarina
FTY720	Fingolimod
Glu	Glutamato
GSK-3β	Cinasa glicógeno sintasa 3 β
GTP	Guanosín trifosfato
HEAT	Secuencia de elongación A de huntingtina subunidad TOR (del inglés <i>huntingtin-elongation-A subunit-TOR</i>)
HRP	Peroxidasa de rábano picante (del inglés <i>horseradish peroxidase</i>)
I+D	Investigación y desarrollo
I₁^{PP1}	Inhibidor endógeno 1 de PP1
I₁^{PP2A}	Inhibidor endógeno 1 de PP2A
I₂^{PP2A}	Inhibidor endógeno 2 de PP2A
IP₃	Inositol-(1,4,5)-trifosfato
J	Constante de acoplamiento
LCMT-1	Leucina carboxilo metiltransferasa 1
lit.	Literatura
m	Multiplete
MAPK	Proteínas cinasas activadas por mitógeno (del inglés, <i>mitogen-activated protein kinases</i>)
Mel	Melatonina
Mem	Memantina

MTT	Bromuro de 3-[4,5-dimetilazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio
nAChR	Receptor nicotínico para acetilcolina (del inglés <i>nicotinic acetylcholine receptor</i>)
NFT	Ovillos neurofibrilares (del inglés <i>neurofibrillary tangles</i>)
NSCLC	Cáncer de pulmón de células no pequeñas o no microcítico (del inglés <i>non-small cell lung cancer</i>)
NMDA	<i>N</i> -metil-D-aspartato
OMS	Organización Mundial de la Salud
p53	Proteína 53
PAD	Fármacos activadores de PP2A (del inglés <i>PP2A-activating drugs</i>)
P.f.	Punto de fusión
PHF	Pares de filamentos helicoidales (PHF, por sus siglas del inglés <i>paired helical filaments</i>)
PI	Yoduro de propidio
PIP	Proteínas que interaccionan con PP1
PI3K	Fosfatidilinositol-3-cinasa
PKA	Proteína cinasa A
PM	Peso molecular
PME-1	PP2A-metilesterasa 1
pNPP	Fosfato de <i>p</i> -nitrofenol
PP1	Fosfoproteína fosfatasa 1 (del inglés <i>phosphoprotein phosphatase 1</i>)
PP1c	Subunidad catalítica de PP1
PP2A	Fosfoproteína fosfatasa 2A (del inglés <i>phosphoprotein phosphatase 2A</i>)
PP2Ac	Subunidad catalítica de PP2A
PP4	Fosfoproteína fosfatasa 4 (del inglés <i>phosphoprotein phosphatase 4</i>)
PP5	Fosfoproteína fosfatasa 5 (del inglés <i>phosphoprotein phosphatase 5</i>)
PP6	Fosfoproteína fosfatasa 6 (del inglés <i>phosphoprotein phosphatase 6</i>)
PP7	Fosfoproteína fosfatasa 7 (del inglés <i>phosphoprotein phosphatase 7</i>)
ppm	Partes por millón
PPP	Fosfoproteínas fosfatasas (del inglés <i>phosphoprotein phosphatases</i>)
PSA	Área de superficie polar (del inglés <i>polar surface area</i>)
PSEN-1	Presenilina 1
PSEN-2	Presenilina 2
PTPA	Activador fosfotirosil fosfatasa (del inglés <i>phosphotyrosyl phosphatase activator</i>)
R/O	Rotenona y Oligomicina A

RMN	Resonancia Magnética Nuclear
Rdto	Rendimiento
s	Singlete
S1P	Esfingosina 1-fosfato
SAR	Relación estructura-actividad (del inglés <i>structure-activity relationship</i>)
SCC	Carcinoma de pulmón de células escamosas (del inglés <i>squamous cell carcinoma</i>)
Ser	Serina
SFB	Suero Fetal Bovino
SIdI	Servicio Interdepartamental de Investigación de la UAM
SMAP	Molécula pequeña activadora de PP2A (del inglés <i>small-molecule activator of PP2A</i>)
SNC	Sistema nervioso central
t	Triplete
t.a.	Temperatura ambiente
TBAF	Fluoruro de tetrabutilamonio
TBDPS	<i>t</i> -butildifenilsililo
TBS	<i>t</i> -butildimetilsililo
TEA	Trietilamina
THF	Tetrahidrofurano
Thr	Treonina
TIPRL	Regulador de la vía de señalización TOR (TIPRL, del inglés <i>Tip41-like protein</i>)
TLC	Cromatografía en capa fina (del inglés <i>thin layer chromatography</i>)
TMS	Trimetilsililo
Tyr	Tirosina
UAM	Universidad Autónoma de Madrid
α4	Proteína de unión a inmunoglobulina α
βA	β-amiloide
δ	Desplazamiento químico

ÍNDICE

ÍNDICE

MARCO DE LA TESIS	3
JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	7
RESUMEN/ABSTRACT	11
INTRODUCCIÓN	15
1. PROCESOS DE FOSFORILACIÓN CELULAR	15
2. ENZIMAS CINASAS Y FOSFATASAS	16
3. LA PROTEÍNA FOSFATASA 2A	20
4. CÁNCER DE PULMÓN	23
4.1. Introducción	23
4.2. Etiología	25
4.3. Tratamiento	26
4.3.1. Cisplatino y cáncer de pulmón	27
4.4. PP2A y cáncer de pulmón	30
5. ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	32
5.1. Introducción	32
5.2. Etiología	33
5.2.1. Hipótesis colinérgica	34
5.2.2. Hipótesis amiloide	35
5.2.3. Hipótesis tau	36
5.3. Tratamiento	38
5.4. PP2A y enfermedad de Alzheimer	39
6. MODULACIÓN FARMACOLÓGICA DE PP2A	42
HIPÓTESIS DE TRABAJO	51
OBJETIVOS	55
MATERIALES Y MÉTODOS	59
1. MATERIALES Y MÉTODOS DE SÍNTESIS QUÍMICA, CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y ESTUDIO COMPUTACIONAL	59
1.1. Materiales utilizados	59
1.2. Métodos experimentales de caracterización analítica, estructural y de determinación de la pureza de los compuestos	59
1.2.1. Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)	59
1.2.2. Espectrometría de Masas Molecular	60
1.2.3. Puntos de fusión (Pf)	60
1.2.4. Rotación óptica	60
1.2.5. Análisis químico elemental	61
1.2.6. Difracción de rayos X	61

1.3. Síntesis química	61
1.3.1. Síntesis de acetato de [(2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)-3-acetoxi-6-alil-3,6-dihidro-2 <i>H</i> -piran-2-il]metilo (1)	61
1.3.2. Síntesis de (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)-6-alil-3,6-dihidro-2-(hidroximetil)-3,6-dihidro-2 <i>H</i> -piran-3-ol (2)	62
1.3.3. Síntesis de (4 <i>aR</i> ,6 <i>R</i> ,8 <i>aS</i>)-6-alil-2-fenil-4,4 <i>a</i> ,6,8 <i>a</i> -tetrahidropirano[3,2- <i>d</i>][1,3]dioxina (3)	62
1.3.4. Síntesis de (2 <i>R</i>)-3-[(4 <i>aR</i> ,6 <i>R</i> ,8 <i>aS</i>)-2-fenil-4,4 <i>a</i> ,6,8 <i>a</i> -tetrahidropirano[3,2- <i>d</i>][1,3]dioxin-6-il]propano-1,2-diol (4)	63
1.3.5. Síntesis de (2 <i>S</i>)-3-[(4 <i>aR</i> ,6 <i>R</i> ,8 <i>aS</i>)-2-fenil-4,4 <i>a</i> ,6,8 <i>a</i> -tetrahidropirano[3,2- <i>d</i>][1,3]dioxin-6-il]propano-1,2-diol (5)	64
1.3.6. Síntesis de 3-[(4 <i>aR</i> ,8 <i>aS</i>)-2-fenil-4,4 <i>a</i> ,6,8 <i>a</i> -tetrahidropirano[3,2- <i>d</i>][1,3]dioxin-6-il]propano-1-ol (6)	64
1.3.7. Síntesis de benzoato de 3-[(4 <i>aR</i> ,6 <i>R</i> ,8 <i>aS</i>)-2-fenil-4,4 <i>a</i> ,6,8 <i>a</i> -tetrahidropirano[3,2- <i>d</i>][1,3]dioxin-6-il]propilo (7)	65
1.3.8. Síntesis de (4 <i>aR</i> ,6 <i>R</i> ,8 <i>aS</i>)-6-alil-2,2-dimetil-4,4 <i>a</i> ,6,8 <i>a</i> -tetrahidropirano[3,2- <i>d</i>][1,3]dioxina (8)	66
1.3.9. Síntesis de (2 <i>R</i>)-3-[(4 <i>aR</i> ,6 <i>R</i> ,8 <i>aS</i>)-2,2-dimetil-4,4 <i>a</i> ,6,8 <i>a</i> -tetrahidropirano[3,2- <i>d</i>][1,3]dioxin-6-il]propano-1,2-diol (9)	66
1.3.10. Síntesis de (2 <i>S</i>)-3-[(4 <i>aR</i> ,6 <i>R</i> ,8 <i>aS</i>)-2,2-dimetil-4,4 <i>a</i> ,6,8 <i>a</i> -tetrahidropirano[3,2- <i>d</i>][1,3]dioxin-6-il]propano-1,2-diol (10)	67
1.3.11. Síntesis de 3-[(4 <i>aR</i> ,6 <i>R</i> ,8 <i>aS</i>)-2,2-dimetil-4,4 <i>a</i> ,6,8 <i>a</i> -tetrahidropirano[3,2- <i>d</i>][1,3]dioxin-6-il]propano-1-ol (11)	67
1.3.12. Síntesis de benzoato de 3-[(4 <i>aR</i> ,6 <i>R</i> ,8 <i>aS</i>)-2,2-dimetil-4,4 <i>a</i> ,6,8 <i>a</i> -tetrahidropirano[3,2- <i>d</i>][1,3]dioxin-6-il]propilo (12)	68
1.3.13. Síntesis de benzoato de 3-[(2 <i>R</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)-5,6-dihidro-5-hidroxi-6-(hidroximetil)-2 <i>H</i> -piran-2-il]propilo (13)	69
1.3.14. Síntesis de (4 <i>aR</i> ,5 <i>aR</i> ,9 <i>aS</i> ,10 <i>S</i> ,10 <i>aS</i>)-2,2-dimetiloctahidro-4 <i>H</i> -pirano[2',3':5,6]pirano[3,2- <i>d</i>][1,3]dioxin-10-ol (14)	69
1.3.15. Síntesis de (4 <i>aR</i> ,5 <i>aR</i> ,10 <i>S</i> ,10 <i>aR</i>)-2,2-dimetiloctahidro-10-metoxi-4 <i>H</i> -pirano[2',3':5,6]pirano[3,2- <i>d</i>][1,3]dioxina (15)	70
1.3.16. Síntesis de (2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,8 <i>aR</i>)-2-(hidroximetil)-4-metoxioctahidropirano[3,2- <i>b</i>]piran-3-ol (16)	70
1.3.17. Síntesis de (2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,8 <i>aR</i>)-2-([(tert-butildimetilsilil)oxi]metil)-4-metoxioctahidropirano[3,2- <i>b</i>]piran-3-ol (17)	71
1.3.18. Síntesis de (2 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,8 <i>aR</i>)-2-([(tert-butildimetilsilil)oxi]metil)-4-metoxihexahidropirano[3,2- <i>b</i>]piran-3(2 <i>H</i>)-ona (18)	71
1.3.19. Síntesis de tert-butil([(2 <i>S</i> ,4 <i>R</i> ,8 <i>aR</i>)-3-metilen-4-metoxioctahidropirano[3,2- <i>b</i>]piran-2-il]metoxi)dimetilsilano (19)	72
1.3.20. Síntesis de [(2 <i>S</i> ,4 <i>R</i> ,8 <i>aR</i>)-3-metilen-4-metoxioctahidropirano[3,2- <i>b</i>]piran-2-il]metanol (20)	73
1.4. Estudio computacional	73
1.5. Cálculo de los parámetros fisicoquímicos	74
2. MATERIALES Y MÉTODOS DE EVALUACIÓN FARMACOLÓGICA	75
2.1. Materiales utilizados	75
2.2. Mantenimiento de las células en cultivo	76
2.2.1. Línea celular de adenocarcinoma humano A549	76
2.2.2. Línea celular HEK 293T embrionaria de riñón humano	77

2.2.3. Línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y	77
2.2.4. Cultivo primario de neuronas de corteza total de embrión de rata	78
2.3. Experimentos de evaluación farmacológica	79
2.3.1. Evaluación de la toxicidad <i>per se</i>	79
2.3.2. Experimentos de neuroprotección en células SH-SY5Y	79
2.3.3. Experimentos de neuroprotección en neuronas de corteza total de embrión de rata	79
2.3.4. Evaluación de la viabilidad celular mediante el método de reducción de MTT	79
2.3.5. Evaluación de la actividad fosfatasa mediante el método del pNPP	80
2.3.6. Preparación de los plásmidos, transfección de células HEK 293T e inmunoprecipitación de PP2A	81
2.3.7. Ensayo de actividad PP2A: Método verde malaquita	82
2.3.8. Determinación de la apoptosis por citometría de flujo	82
2.3.9. Detección de la expresión proteica celular por <i>western blot</i>	83
2.4. Análisis estadístico y representación de los datos farmacológicos	83
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	87
1. BÚSQUEDA Y DISEÑO DE NUEVOS COMPUESTOS ACTIVADORES DE PP2A	87
1.1. Relación estructura-actividad del ácido okadaico y otros inhibidores selectivos de PP2A	87
1.2. Diseño de análogos de ácido okadaico carentes de potencial inhibidor	91
1.3. Conclusiones parciales	93
2. SÍNTESIS ORGÁNICA Y CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE ANÁLOGOS DE ÁCIDO OKADAICO	95
2.1. Reacciones químicas y caracterización estructural	95
2.1.1. Reacción de Hosomi-Sakurai	95
2.1.2. Hidrólisis de los acetilos	96
2.1.3. Protección del diol 2	96
2.1.4. Dihidroxilación asimétrica de Sharpless. Obtención de 4 y 5	97
2.1.5. Hidroboración-oxidación de 3	99
2.1.6. Benzoilación de 6	101
2.1.7. Protección alternativa del diol 2	102
2.1.8. Dihidroxilación asimétrica de Sharpless. Obtención de 9 y 10	102
2.1.9. Hidroboración-oxidación de 8	103
2.1.10. Benzoilación del alcohol 11	103
2.1.11. Epoxidación y ciclación de 11	104
2.1.12. Metilación del alcohol 14	106
2.1.13. Hidrólisis del acetal 15	106
2.1.14. Protección parcial del diol 16 con TBSCl	108
2.1.15. Reacción de Dess-Martin	108
2.1.16. Reacción de Wittig	109
2.1.17. Preparación del análogo al fragmento C19–C27 de AO: desprotección final	110

2.2. Discusión general	111
2.3. Conclusiones parciales	113
3. PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS <i>IN SILICO</i>	115
3.1. Introducción	115
3.2. Propiedades físicoquímicas determinantes para el paso de la barrera hematoencefálica	117
3.3. Resultados y discusión del estudio del paso de barrera hematoencefálica de los análogos de ácido okadaico	118
3.4. Conclusiones parciales	120
4. EVALUACIÓN FARMACOLÓGICA DEL COMPUESTO 1 EN UN MODELO <i>IN VITRO</i> DE CÁNCER DE PULMÓN	121
4.1. Estudio de <i>docking</i> molecular del compuesto 1 y PP2Ac	121
4.2. Efecto del compuesto 1 sobre la actividad de distintas isoformas de PP2A	122
4.3. Evaluación del efecto citotóxico del compuesto 1	125
4.4. El compuesto 1 restaura la apoptosis inducida por cisplatino comprometida por efecto de nicotina en células A549	126
4.5. Efecto del compuesto 1 sobre la expresión de diversas proteínas reguladas por PP2A en células A549	128
4.6. Mecanismo de acción del compuesto 1	130
4.7. Discusión general	132
4.8. Conclusiones parciales	134
5. EVALUACIÓN DEL PERFIL NEUROPROTECTOR DE LOS COMPUESTOS SINTETIZADOS	135
5.1. Estudio de <i>docking</i> molecular de los compuestos y PP2Ac	135
5.2. Toxicidad <i>per se</i> de los derivados de AO	139
5.3. Efecto sobre las Ser/Thr fosfatasas	141
5.4. Modelo de hiperfosforilación de tau inducido por AO en células SH-SY5Y	147
5.5. Modelo de estrés oxidativo inducido por rotenona/oligomicina A en células SH-SY5Y	150
5.6. Modelo de excitotoxicidad inducido por glutamato en cultivo primario de neuronas de embrión de rata	153
5.7. Efecto del compuesto 9 sobre la expresión proteica	155
5.8. Discusión general	158
5.9. Conclusiones parciales	162
CONCLUSIONES/CONCLUSIONS	165
BIBLIOGRAFÍA	169
ANEXOS	191

MARCO DE LA TESIS DOCTORAL

Esta Memoria de Tesis para la obtención de Grado de Doctor se ha realizado bajo la tutela del Dr. Cristóbal de los Ríos Salgado y de la Dra. Carmen Montiel López, en el laboratorio L8 del Departamento de Farmacología y Terapéutica de la Facultad de Medicina, de la Universidad Autónoma de Madrid (UAM), vinculado al Instituto Fundación Teófilo Hernando de I+D del Medicamento, y en el laboratorio L2 de dicho Departamento.

El grupo de investigación del Dr. Cristóbal de los Ríos Salgado, Investigador Miguel Servet II del Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Universitario de La Princesa, está dedicado al desarrollo de nuevos compuestos con potenciales propiedades neuroprotectoras para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer. Entre sus líneas de investigación destacan el estudio de la regulación de la dinámica del Ca^{2+} citosólico, a través de la modulación farmacológica del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ mitocondrial, así como el mantenimiento de la actividad de las enzimas Ser/Thr fosfatasas. El grupo dispone de una unidad de química médica para sintetizar nuevos principios activos, una unidad de evaluación farmacológica para el estudio del potencial neuroprotector de los nuevos compuestos y una estación computacional de trabajo donde se lleva a cabo la modelización molecular de los compuestos propuestos.

La Dra. Carmen Montiel López es Catedrática de Farmacología de la UAM. Su grupo de investigación cuenta con amplia experiencia en la respuesta inflamatoria sistémica, el estudio del papel fisiopatológico de los receptores nicotínicos $\alpha 7$ y $\text{dup}\alpha 7$, y la identificación de los mecanismos moleculares implicados en la disminución de la eficacia terapéutica de nuevos fármacos antineoplásicos producida por el consumo continuado de tabaco en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico. Su laboratorio posee las instalaciones necesarias para realizar la siguiente metodología en relación con esta Tesis: cultivos celulares, tratamientos farmacológicos, *immunoblots*, ensayos colorimétricos y medida de apoptosis celular por citometría de flujo.

Por último, se realizó una estancia internacional en la Universidad KU Leuven (Bélgica), bajo la supervisión de la Dra. Veerle Janssens, cuyo grupo de investigación se dedica a estudiar la relación entre la disminución de la actividad enzimática de PP2A y el desarrollo de diversos tipos de cáncer.

JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

El cáncer de pulmón representa el tumor maligno con mayor incidencia y mortalidad a nivel mundial. El consumo de tabaco se correlaciona con el 90 % de los casos de cáncer de pulmón y la gran adicción que provoca hace que los pacientes tengan grandes dificultades para dejar de fumar. El cáncer de pulmón no microcítico es el subtipo principal de cáncer de pulmón, reuniendo el 75–85 % de todos los casos, y se asocia con un mal pronóstico. El fármaco quimioterapéutico cisplatino y sus derivados siguen siendo la primera línea de tratamiento para la mayoría de los pacientes, a pesar de la gravedad de los efectos adversos que provoca su administración y la recurrente aparición de quimiorresistencia. Así pues, la búsqueda de nuevas terapias farmacológicas para el tratamiento de los pacientes con cáncer de pulmón no microcítico sigue siendo una demanda de primer orden.

Por otra parte, el aumento del promedio de la esperanza de vida a nivel mundial conlleva un incremento en la incidencia y la prevalencia de las patologías asociadas a la vejez, tales como las enfermedades neurodegenerativas. La enfermedad de Alzheimer es la forma de demencia más prevalente. A pesar de los esfuerzos de la comunidad científica, todavía no existe una alternativa terapéutica eficaz, por lo que el desarrollo de nuevos fármacos capaces de detener la progresión de la enfermedad es una necesidad socioeconómica urgente.

En relación a la modulación farmacológica de los procesos de fosforilación celular cuando estos se ven alterados en enfermedades, como el cáncer o la enfermedad de Alzheimer, la mayoría de los compuestos ensayados en estas patologías siguen la estrategia clásica de inhibir las enzimas cinasas. Por el contrario, en esta Memoria se plantea como hipótesis de trabajo un nuevo abordaje farmacológico para el tratamiento de enfermedades que cursan con una desregulación de la actividad Ser/Thr fosfatasa de PP2A, basada en una activación de esta enzima a través de la competición con sus inhibidores endógenos, cuya expresión se encuentra aumentada, según se ha descrito, en varios tipos de cáncer y en la enfermedad de Alzheimer.

RESUMEN/ABSTRACT

La proteína fosfatasa 2A (PP2A) es una importante Ser/Thr fosfatasa que participa en la regulación de múltiples procesos celulares, por lo que no es extraño que una deficiente actividad de esta enzima esté implicada en la etiopatogenia de diversas enfermedades como el cáncer o la enfermedad de Alzheimer. En el cáncer de pulmón, el consumo continuado de tabaco tras el diagnóstico no solo contribuye al inicio y progresión de la enfermedad, sino que también disminuye la eficacia de la quimioterapia. En particular, la nicotina, el principal componente adictivo del tabaco, juega un papel clave en la quimiorresistencia, inhibiendo la apoptosis y activando rutas de supervivencia celular, como Akt y ERK1/2, así como reduciendo la estabilidad de Bax, que, en conjunto, contrarrestan los efectos citotóxicos de los agentes quimioterapéuticos, como cisplatino. Por el contrario, PP2A desfosforila Bax, lo que favorece la apoptosis en las células tumorales. En la enfermedad de Alzheimer, una de las características histopatológicas principales son los ovillos neurofibrilares, formados por la proteína tau hiperfosforilada. Este desequilibrio en los niveles de fosforilación de tau se debe, entre otras causas, a una disminución en la actividad de PP2A en cerebros de pacientes.

Dada la implicación de PP2A en múltiples procesos fisiopatológicos, esta Tesis tiene como objetivo diseñar, sintetizar y cribar farmacológicamente nuevos compuestos capaces de aumentar la actividad fosfatasa de PP2A en: 1) un modelo de quimiorresistencia inducida por nicotina y 2) un modelo de hiperfosforilación de tau y neurodegeneración. Tomando como referencia la toxina inhibidora de PP2A ácido okadaico (AO), se presenta el diseño y síntesis de 20 compuestos análogos al fragmento C19–C27 de AO. Estos compuestos carecen de los motivos inhibidores de PP2A, pero mantienen la afinidad por el sitio catalítico de la enzima, de manera que puedan competir con los inhibidores endógenos de PP2A, que se encuentran incrementados en las patologías comentadas anteriormente. El compuesto **1**, evaluado en células de adenocarcinoma de pulmón humano, es capaz de revertir la pérdida de la eficacia apoptótica del cisplatino inducida por nicotina mediante la activación de PP2A. En el contexto de la enfermedad de Alzheimer, en general, todos los compuestos muestran un buen perfil neuroprotector frente a la hiperfosforilación de tau inducida por AO, y algunos, adicionalmente, frente al estrés oxidativo y la excitotoxicidad por glutamato.

Protein phosphatase 2A (PP2A) is an important Ser/Thr phosphatase that participates in the regulation of multiple cellular processes, thus it is not surprising that a deficient activity of this enzyme is involved in the etiopathogenesis of various diseases such as cancer or Alzheimer's disease. In lung cancer, continued tobacco consumption after diagnosis not only contributes to the onset and progression of the disease, but also reduces the effectiveness of chemotherapy. In particular, nicotine, the main addictive component of tobacco, plays a key role in chemoresistance, inhibiting apoptosis and activating cell survival pathways, such as Akt and ERK1/2, as well as reducing the stability of Bax, that, together, counteract the cytotoxic effects of chemotherapeutic agents, such as cisplatin. In contrast, PP2A dephosphorylates Bax, which promotes apoptosis in tumor cells. In Alzheimer's disease, one of the main histopathological features are neurofibrillary tangles, formed by the hyperphosphorylated protein tau. This imbalance in tau phosphorylation levels is, among other causes, due to a decrease in PP2A activity in patients' brains.

Given the involvement of PP2A in multiple pathophysiological processes, this Thesis aims to design, synthesize and pharmacologically screen new compounds capable of increasing the phosphatase activity of PP2A in: 1) a model of nicotine-induced chemoresistance and 2) a model of tau hyperphosphorylation and neurodegeneration. Taking as reference the PP2A inhibitory toxin okadaic acid (OA), the design and synthesis of 20 compounds analogs to the C19–C27 fragment of OA are presented. These compounds lack the inhibitory motifs of PP2A but maintain the affinity for the catalytic site of the enzyme, thereby they can compete with endogenous PP2A inhibitors, increased in the pathologies discussed above. Compound **1**, evaluated in human lung adenocarcinoma cells, is capable of reversing the nicotine-induced loss of apoptotic efficacy of cisplatin by activating PP2A. In the context of Alzheimer's disease, in general, all compounds show a good neuroprotective profile against OA-induced hyperphosphorylation of tau, and some compounds additionally protect against oxidative stress and glutamate excitotoxicity.

INTRODUCCIÓN

1. PROCESOS DE FOSFORILACIÓN CELULAR

La fosforilación de proteínas es un mecanismo fundamental en la mayoría de los procesos celulares, como en la síntesis de proteínas, la división celular o la transducción de señales. De hecho, muchas enzimas y receptores se activan y desactivan mediante eventos de fosforilación/desfosforilación mediados por cinasas y fosfatasaes específicas, respectivamente.¹ La fosforilación es el proceso molecular mediante el cual un grupo fosfato, libre o aportado por una molécula donadora, es transferido a una molécula aceptora. En el caso de las proteínas, el proceso de fosforilación constituye una de las modificaciones postraduccionales o epigenéticas más frecuentes y, en muchos casos, desencadena una respuesta en cascada que amplifica la señal inicial. Así, una sola fosforilación proteica es capaz de activar múltiples receptores dianas.

En el contexto de la comunicación y señalización celular, los procesos de fosforilación/desfosforilación permiten modificar, de forma reversible, la conformación, actividad o localización de una determinada proteína.¹ El grupo fosfato es un anión trivalente compuesto por un átomo de fósforo y 4 oxígenos covalentemente unidos (PO_4^{3-}), en disposición tetraédrica respecto al fósforo. La capacidad interactiva del grupo fosfato se debe, fundamentalmente, a que el fósforo posee 5 electrones en la capa de valencia capaces de formar un máximo de 5 enlaces covalentes, tiene alta solubilidad en agua y puede formar ésteres mono-, di- o trialquílicos, así como arílicos con alcoholes libres, pero también anhídridos de ácido (Figura 1).²

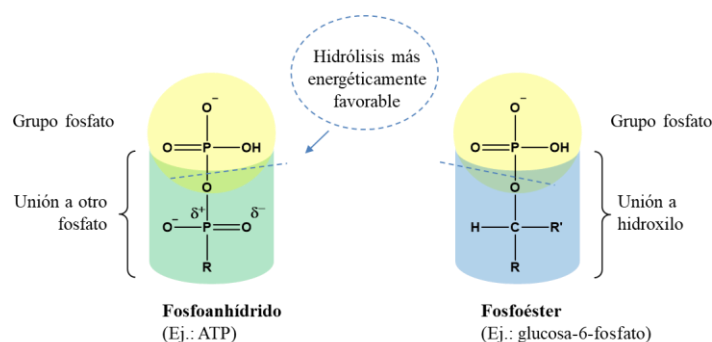


Figura 1. Tipos de enlaces de fosfato.

Los principales donadores de grupos fosfato en las células son las bases nitrogenadas trifosforiladas, ATP y GTP. El proceso de generación de ATP, conocido como fosforilación oxidativa, es fundamental para poder trasladar energía hacia las proteínas. Las dos bases nitrogenadas anteriores, con 3 grupos fosfato cada una, son utilizadas por una gran variedad de enzimas para obtener energía tras la ruptura del enlace del fosfato y la posterior transferencia del grupo fosfato liberado a otra molécula, aumentando así el potencial energético de esta última.

El proceso de fosforilación confiere a las proteínas un mayor nivel energético. La energía liberada durante la hidrólisis del grupo fosfato unido a las proteínas sustrato, reacción catalizada por enzimas fosfatasas, se emplea para producir cambios bioquímicos en las moléculas sustrato. Dichos cambios pueden originar modificaciones conformacionales de la molécula afectada, generación de enlaces entre moléculas o ruptura de cadenas hidrocarbonadas. Por el contrario, la incorporación de un grupo fosfato a la proteína sustrato transforma el sitio de unión de apolar hidrofóbico a polar hidrofílico, lo que puede inducir otros cambios conformacionales de la proteína y modificar la manera en que interactúa con otras moléculas.² En las proteínas, los aminoácidos que se fosforilan con mayor frecuencia son las serinas (Ser, 86,4 %), treoninas (Thr, 11,8 %) y tirosinas (Tyr, 1,8 %). Los alcoholes libres de estos aminoácidos forman un enlace éster con el grupo fosfato.^{3,4}

En los procesos de fosforilación/desfosforilación, es de vital importancia el mantenimiento de un preciso equilibrio entre las actividades opuestas de cinasas y fosfatasas, de forma que se consiga el adecuado estado de fosforilación proteica (Figura 2). En condiciones fisiológicas, dicho equilibrio está ligeramente escorado hacia el estado de desfosforilación, por lo que se cree que las fosfatasas desempeñan un papel más relevante en el mantenimiento del citado equilibrio. De hecho, la desregulación de este fino equilibrio se ha asociado a una gran variedad de enfermedades, como cáncer, diabetes, enfermedades cardiovasculares o neurodegenerativas.^{5,6}

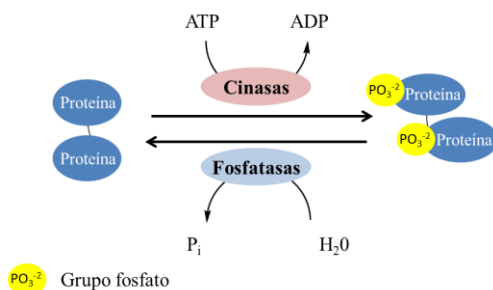


Figura 2. Esquema simplificado de los procesos de fosforilación/desfosforilación proteica.

2. ENZIMAS CINASAS Y FOSFATASAS

Se estima que la actividad de casi un tercio de las proteínas celulares puede ser regulada por procesos de fosforilación/desfosforilación.¹ El genoma humano contiene, aproximadamente, 568 genes que codifican para proteínas cinasas. Dada la exquisita especificidad de la señalización generada por los procesos de fosforilación, así como su naturaleza reversible, se ha postulado que el genoma humano debe codificar para un número de proteínas fosfatasas similar al de las cinasas. Pero la realidad no es tal ya que solo se han identificado 156 genes que codifican para proteínas fosfatasas. Este último dato induce la errónea creencia de que las proteínas fosfatasas son más

inespecíficas que las cinasas.⁷ No obstante, esta supuesta falta de especificidad atribuida a las fosfatasa es rebatible dado el considerable número de subunidades reguladoras que presentan este tipo de enzimas, así como por la existencia de diferentes isoformas, que se ensamblan dando lugar a un elevado número de holoenzimas. Así, se puede estimar que el número funcional de cinasas y fosfatasa es, prácticamente, parejo.

Proteínas cinasas

Las proteínas cinasas son responsables de los procesos de fosforilación celular.¹ La activación o desactivación de estas enzimas puede producirse de diversas maneras: 1) a través de su fosforilación (en ocasiones, es la propia cinasa la que se autofosforila); 2) por unión con proteínas activadoras, inhibidoras o moléculas pequeñas; o 3) modificando su ubicación celular con respecto a sus sustratos.⁸

Las proteínas cinasas suelen clasificarse en función del residuo aminoacídico que fosforilan. La mayoría de ellas fosforilan residuos de Ser y Thr (Ser/Thr cinasas), otras están dirigidas a residuos de Tyr (Tyr cinasas), mientras que un número mucho menor actúa indistintamente sobre los tres aminoácidos anteriores (cinasas de doble especificidad). Dentro de la categoría de las Ser/Thr cinasas, las dos familias más importantes son la AGC (por las proteínas cinasas A, G y C) y la de las cinasas activadas por mitógeno, MAPK (del inglés, *mitogen-activated protein kinases*). La primera familia de Ser/Thr cinasas está integrada por más de 80 miembros, mientras que la segunda abarca unos 20 miembros. Entre las Tyr cinasas se distinguen dos tipos principales según su ubicación celular: las que actúan como receptores de membrana (58 miembros agrupados en 20 familias) y las intracelulares (30 miembros agrupados en 11 familias).⁶

La estructura de todas las proteínas cinasas comprende varios dominios de los que, al menos, tres de ellos constituyen la parte esencial de la enzima: 1) el dominio catalítico, en el cual se distinguen dos sitios: uno, de unión al ATP y el otro, que interviene en la catálisis y que contiene un aminoácido hidroxilado cuya fosforilación incide en el estado funcional de la enzima; 2) un dominio de regulación que, bien por cambios conformacionales o bien por la unión con otras moléculas, puede influir en la mayor o menor actividad enzimática; y 3) un tercer dominio de autoinhibición que, en la mayoría de los casos, contiene una secuencia de aminoácidos similar a la que es reconocida por la enzima durante la catálisis, pero que no contiene el aminoácido hidroxilado. Este último dominio se asocia con el sitio catalítico y mantiene a la enzima en un estado inactivo hasta que se produce la activación por el dominio regulador.³

Proteínas fosfatasas

Según su especificidad por el sustrato, existen tres tipos de proteínas fosfatasas: Tyr fosfatasas, Ser/Thr fosfatasas y fosfatasas duales. Las Ser/Thr fosfatasas incluyen a las fosfoproteínas (PPP, por sus siglas en inglés *phosphoprotein phosphatases*), las proteínas fosfatasas dependientes de metales (PPM, por sus siglas en inglés *metal-dependent protein phosphatases*) y las fosfatasas basadas en aspartato (Fcp/Scp).⁹ A diferencia de las PPP, los miembros de la familia PPM, como PP2C y fosfatasa piruvato deshidrogenasa, no poseen subunidades reguladoras sino dominios adicionales y motivos de secuencia conservados que pueden ayudar a determinar la especificidad del sustrato. Tanto para PPP como para PPM, los iones metálicos desempeñan un papel catalítico y central, ya que activan una molécula de agua necesaria para la reacción de desfosforilación. Por el contrario, las Fcp/Scp utilizan un mecanismo de catálisis basado en aspartato.

En esta Memoria de Tesis Doctoral nos centraremos en el estudio de la familia de las PPP, que incluye a la fosfoproteína fosfatasa 1 (PP1), fosfoproteína fosfatasa 2A (PP2A), calcineurina (Cn, PP2B o PP3), fosfoproteína fosfatasa 4 (PP4), fosfoproteína fosfatasa 5 (PP5), fosfoproteína fosfatasa 6 (PP6) y fosfoproteína fosfatasa 7 (PP7).

De manera general, todas las PPP comparten una alta homología en el sitio catalítico, tanto en la secuencia de aminoácidos como en el mecanismo de reacción de la hidrólisis de ésteres fosfato, catalizada por metales. En el sitio catalítico, seis aminoácidos estrictamente conservados (tres histidinas, dos ácidos aspárticos y una asparragina) coordinan dos iones metálicos, que pueden ser Mg^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} o Zn^{2+} .⁵ Estos iones metálicos se unen y activan una molécula de agua, la cual inicia un ataque nucleófilo sobre el átomo de fósforo que fuerza la ruptura del enlace con el oxígeno del aminoácido alcohólico de la proteína sustrato (Figura 3).^{10, 11} La mayoría de estas enzimas funcionan como holoenzimas al estar constituidas por una subunidad catalítica conservada y una gran variedad de subunidades reguladoras que modulan la actividad, otorgan especificidad de sustrato y determinan una específica sublocalización celular.

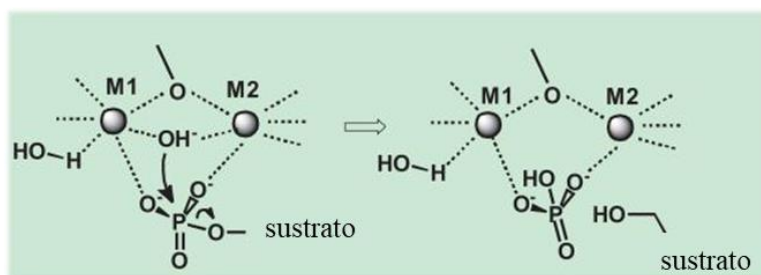


Figura 3. Mecanismo común de desfosforilación de las Ser/Thr fosfatasas PPP y PPM. Dos iones metálicos (M1 y M2) coordinan una molécula de agua en el sitio catalítico. El ion hidroxilo realiza un ataque nucleófilo sobre el grupo fosfato del sustrato produciendo la desfosforilación del aminoácido. Adaptada de Zhang y col., 2013, con modificaciones.⁵

Clásicamente, la disección farmacológica de los diferentes tipos de PPP ha sido realizada mediante la utilización de toxinas que actuaban de forma más o menos selectiva sobre cada tipo. En 1988, Bialojan y Takai encontraron que el ácido okadaico (AO), un poliéter complejo originalmente aislado de la esponja marina *Halichondria okadai* e identificado como el agente causante de la intoxicación diarreica por moluscos, actuaba como un potente inhibidor de PP1 y PP2A.¹² Este descubrimiento supuso el punto de arranque de la búsqueda de nuevos inhibidores de las PPP de origen natural, entre los que destacan la cantaridina, la nodularina, las microcistinas, la caliculina A, la fostriecina, la citostatina o la tautomicina (Figura 4). Estas toxinas ejercen una inhibición de amplio espectro sobre las enzimas PPP a través de su unión al sitio activo, muy próximo a los dos iones metálicos, siendo Cn y PP7 las menos sensibles a las toxinas. Dado que la subunidad catalítica está muy bien conservada en todas las fosfatasa, especialmente en PP1 y PP2A, la selectividad de estas toxinas por uno u otro tipo de enzimas es baja, mostrando valores de CI_{50} muy similares.¹³ Aunque existen toxinas más selectivas que AO, esta toxina continúa siendo el inhibidor más ampliamente utilizado para estudiar los efectos biológicos de PP1 y PP2A.

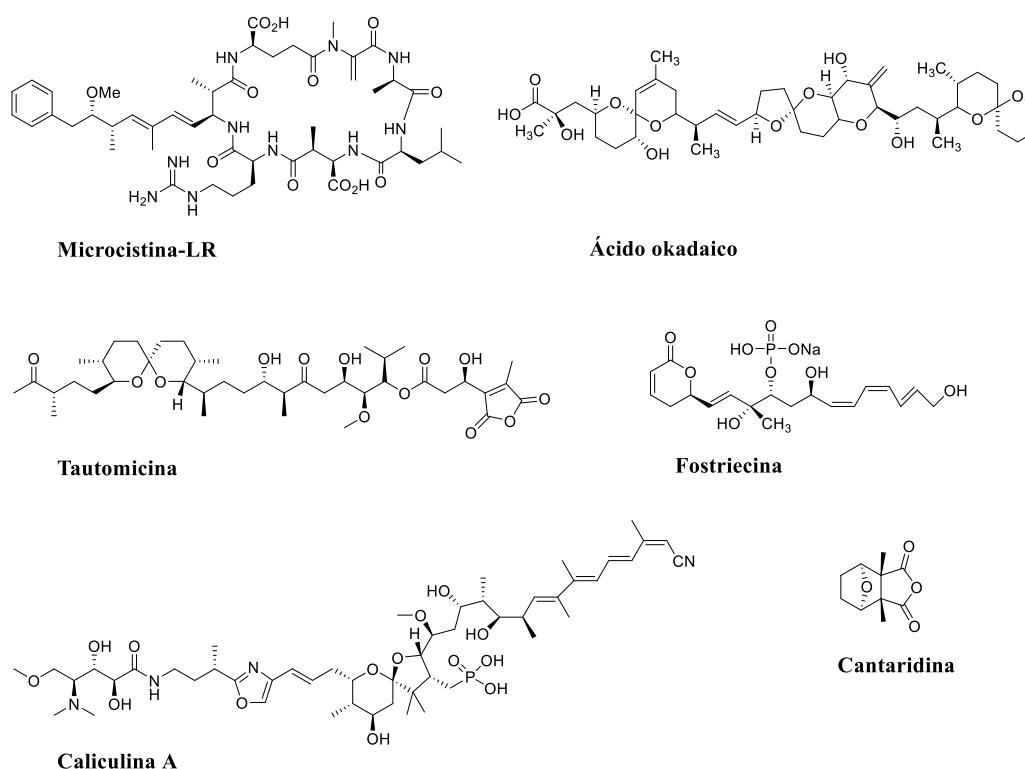


Figura 4. Estructura química de algunos compuestos de origen natural con acción inhibidora de Ser/Thr fosfatasa.

Dentro de la superfamilia de PPP, destacan las enzimas PP1 y PP2A por ser responsables del 90 % de la actividad Ser/Thr fosfatasa celular.¹⁴ PP1 está ubicuamente expresada en todas las células eucariotas, en donde participa en una gran variedad de procesos, incluyendo la meiosis y división celular, apoptosis, síntesis de proteínas, metabolismo, reorganización del citoesqueleto y

regulación de receptores y canales de membrana.^{15, 16} Cada unidad PP1 funcional se presenta en forma de holoenzima integrada por una subunidad catalítica (PP1c, 37 kDa) altamente conservada y una subunidad reguladora o proteína que interacciona con PP1 (PIP), de las que han sido identificadas más de 200 variedades (Figura 5).¹⁷

Existen cuatro isoformas de PP1c (PP1 α , PP1 β/δ , PP1 γ 1 y PP1 γ 2), con los metales Mn²⁺ y Fe²⁺ en el sitio activo. Las PIP permiten dirigir PP1 a un compartimento subcelular específico, modular la especificidad de sustrato, e incluso servir como sustratos de PP1. La interacción entre PIP y PP1c ocurre, principalmente, a través de un motivo denominado RVxF, presente en más del 70 % de las PIP, y de un bolsillo hidrofóbico RVxF/W de PP1c, alejado del sitio catalítico.¹⁸

La diversidad de holoenzimas que se pueden formar permite a PP1c participar en una gran variedad de funciones. La desregulación de PP1 tiene consecuencias en eventos diversos como la regulación del ciclo celular y apoptosis, metabolismo del glucógeno, organización del citoesqueleto, vías de transducción de señales o aprendizaje y memoria, pudiendo participar en el desarrollo de patologías como la enfermedad de Alzheimer (EA) o el cáncer.¹⁸

3. LA PROTEÍNA FOSFATASA 2A

PP2A es una de las enzimas más abundantemente expresada en las células eucariotas (1 % del total de las proteínas celulares) y cataliza entre el 0,3–1 % de las reacciones enzimáticas celulares.^{19, 20} Es una Ser/Thr fosfatasa ubicua muy conservada filogenéticamente desde levaduras hasta humanos. Esta enzima participa en mecanismos fisiológicos esenciales, tales como el desarrollo, la proliferación y muerte celular, la movilidad celular, la dinámica del citoesqueleto, el metabolismo, el control del ciclo celular y la regulación de numerosas vías de señalización.^{21, 22} La estructura de PP2A es un complejo heterotrimérico compuesto por un núcleo central, constituido por una subunidad estructural (A o PR65, 65 kDa) y una subunidad catalítica (C o PP2Ac, 36 kDa), al cual se ensambla una subunidad reguladora (B) que otorga al complejo especificidad de sustrato y localización. Los metales que posee PP2A en el sitio catalítico son dos iones Mn⁺².²³ Las subunidades A y C presentan dos posibles isoformas, α y β , siendo A α y C α , respectivamente, las mayoritarias en la mayoría de las células.²⁴⁻²⁶ En cuanto a la subunidad reguladora B, se han identificado cuatro familias: B (B55 o PR55), B' (B56 o PR61), B'' (PR48, PR72 o PR130) y B''' (PR93, PR110 o estriatina). Cada familia contiene de 2 a 5 isoformas con poca similitud entre ellas (Figura 5).

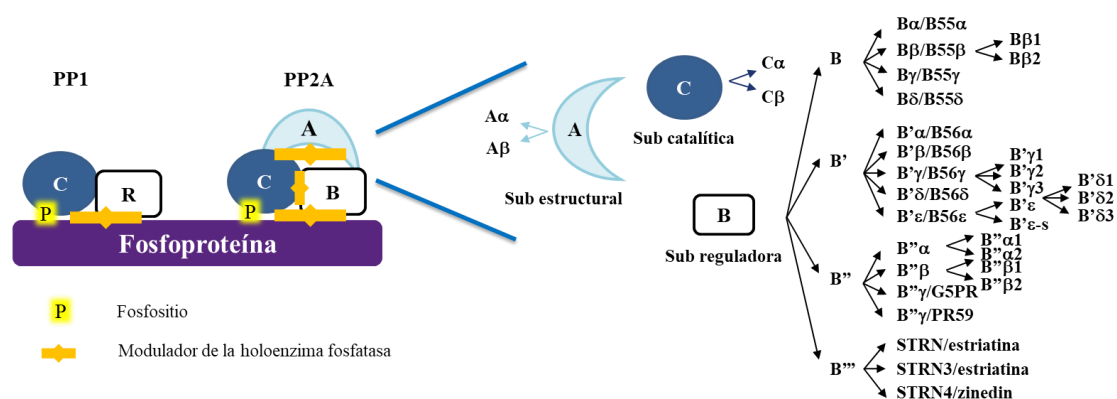


Figura 5. Estructura de PP1 y PP2A. Subunidades (Sub) que conforman PP2A y sus diferentes isoformas.

La diversidad de subunidades e isoformas que pueden conformar PP2A en humanos (son posibles hasta 96 diferentes combinaciones para constituir la holoenzima), junto con sus diferentes niveles de expresión dependiendo del tejido y tipo celular, son responsables de la alta especificidad de sustrato y sublocalización celular de esta fosfatasa.²⁷ Los estudios genéticos sugieren que cada isoforma de PP2A probablemente ejerce funciones celulares no redundantes.²⁸

La subunidad A de PP2A presenta 15 repeticiones en tándem tipo HEAT (del inglés *huntingtin-elongation-A subunit-TOR*), siendo las repeticiones HEAT 11–15 las reconocidas por la subunidad C y las repeticiones HEAT 2–8 las reconocidas por la subunidad B (Figura 6).²⁹

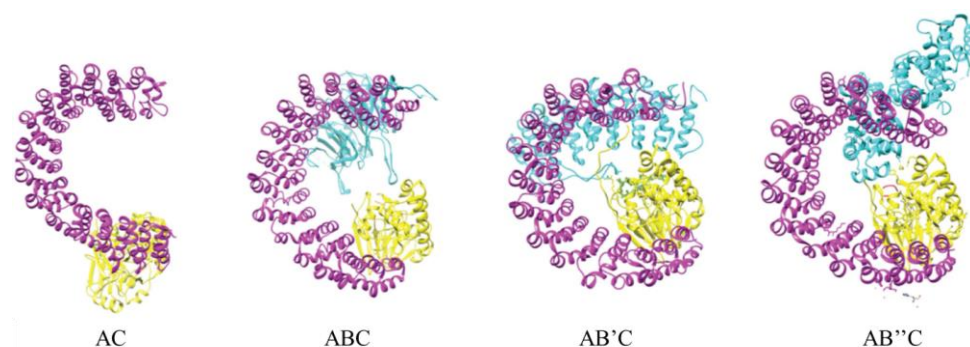


Figura 6. Estructura del núcleo (AC) y diferentes isoformas de PP2A. Se representa en morado la subunidad catalítica C, en amarillo la subunidad estructural A y en azul la subunidad reguladora B. Tomada de Sangodkar y col., 2016.²²

El mecanismo de regulación de PP2A es extraordinariamente complejo (Figura 7).³⁰ Durante la biogénesis de las holoenzimas de PP2A, la actividad fosfatasa de las subunidades catalíticas libres puede suponer un riesgo inherente para la célula, al igual que podría ocurrir si su actividad no estuviese restringida por la interacción con otras subunidades. Para solventar ese problema, la subunidad C libre se sintetiza como forma inactiva, necesitando de una posterior activación, solo conseguida en el mecanismo de ensamblaje de la holoenzima. Sin embargo, durante el anterior proceso, debe asegurarse la estabilidad de PP2Ac ya que la subunidad libre es

inestable y se degrada rápidamente.³⁰ Así pues, tanto la estabilidad de PP2A, como la actividad enzimática y el ensamblaje de la holoenzima están estrictamente controlados por una compleja red de cinco importantes reguladores celulares, como el activador fosfotirosil fosfatasa (PTPA, por sus siglas en inglés *phosphotyrosyl-phosphatase-activator*), la leucina carboxilo metiltransferasa 1 (LCMT-1), la PP2A-metilesterasa 1 (PME-1), la proteína de unión a inmunoglobulina α ($\alpha 4$) y el regulador de la vía de señalización TOR (TIPRL, por sus siglas en inglés *Tip41-like protein*). De este modo, el proceso comienza con la unión de $\alpha 4$ a la subunidad C, lo que produce la inactivación de esta última evitando una actividad fosfatasa indiscriminada.³¹ Posteriormente, PME-1, que tiene una función reguladora dual, se une y estabiliza la conformación inactiva del dímero AC y, al mismo tiempo, evita la metilación prematura a través de su actividad metilesterasa. Para generar las holoenzimas activas, PTPA, con ATP y Mg^{+2} como cofactores, desfosforila el residuo Tyr307 de PP2A promoviendo el plegamiento de la subunidad C en una conformación óptima para que la enzima LCMT-1 metile el carboxilo terminal de la Leu309 de PP2Ac. Esta metilación es necesaria para aumentar la afinidad del núcleo catalítico hacia las subunidades B y permitir la formación de la enzima heterotrimérica completa y activa.³⁰ Por su parte, TIPRL se une de forma selectiva, por un lado, a la subunidad C desmetilada inactivando su sitio activo y, por otro lado, genera contactos inestables con la subunidad A, estabilizando así el dímero inactivo PP2A-AC.^{32,33} La unión de TIPRL a PP2Ac parece realizarse de una manera alostérica, puesto que el AO no es capaz de disociar la unión TIPRL1-PP2Ac.²³

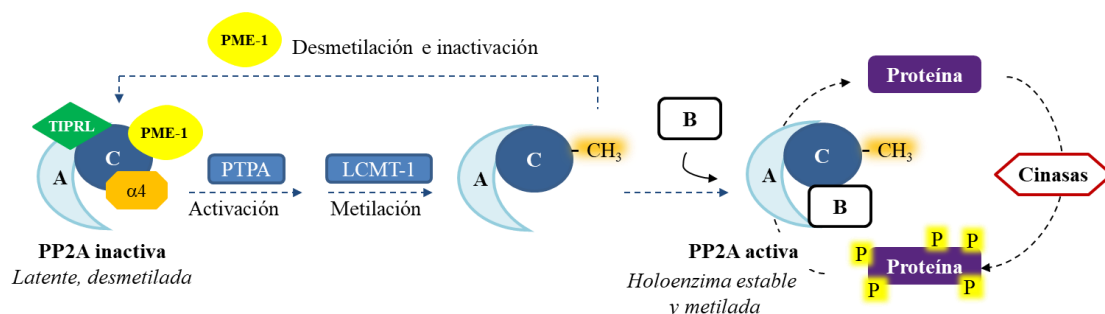


Figura 7. Mecanismos de ensamblaje y regulación de PP2A.

La fosforilación de Thr304 o Tyr307 y la desmetilación en Leu309 en la subunidad C son las modificaciones postraduccionales más frecuentes que pueden inactivar PP2A (Figura 8).

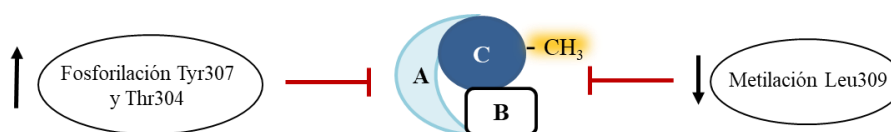


Figura 8. Mecanismos postraduccionales de regulación de PP2A.

La actividad de PP2A también es regulada por proteínas que actúan como inhibidores endógenos específicos, como el inhibidor 1 (I_1^{PP2A} , también denominado ANP32a o PHAP-I), el inhibidor endógeno 2 (I_2^{PP2A} , también llamado SET, PHAP-II o TAF1 β) y CIP2A (por sus siglas en inglés *oncoprotein cancerous inhibitor of PP2A*).^{34, 35} El inhibidor SET ha sido implicado en la aparición y progresión de muchos tipos de cáncer; de hecho, su expresión está aumentada en leucemia mieloide aguda y crónica o en cáncer de pulmón no microcítico, entre otros.³⁶⁻³⁸ Mientras tanto, el papel de I_1^{PP2A} en cáncer es menos conocido. En el contexto de las enfermedades neurodegenerativas, ambos inhibidores se encuentran altamente expresados en cerebro y ejercen su acción a través de su unión directa a PP2Ac, si bien se desconocen los aminoácidos con los que interaccionan. SET tiene una localización preferentemente nuclear, mientras que la de I_1^{PP2A} es citosólica. CIP2A también se encuentra sobreexpresado en diversos tipos de cáncer, como el de ovario, colon, próstata, gástrico o de pulmón no microcítico,³⁹⁻⁴³ así como en pacientes con EA.⁴⁴ CIP2A es una oncoproteína que evita la desfosforilación mediada por PP2A de c-MYC (en Ser62) y de Akt (en Ser473), lo que se traduce en la estabilización del protooncogén y en una mayor actividad de Akt.^{22, 45} Cabe destacar que PP2A es un importante supresor tumoral, en parte debido a su papel en el control del ciclo celular. Así, el aumento de expresión de sus inhibidores endógenos, como CIP2A, es un indicador de peor pronóstico en pacientes con cáncer.⁴⁵

Los complejos mecanismos de regulación de la actividad de PP2A descritos son de gran relevancia, por lo que una alteración de estos puede ocasionar serios efectos deletéreos celulares y contribuir al desarrollo de un gran número de enfermedades. En esta Tesis se ha estudiado el papel que ejerce PP2A en cáncer de pulmón y en la EA, y cómo el desarrollo de ligandos activadores de esta enzima puede ser una alternativa terapéutica para tratar estas patologías.

4. CÁNCER DE PULMÓN

4.1. Introducción

El cáncer de pulmón representa el tumor maligno con mayor incidencia y mortalidad a nivel mundial (Figura 9). Durante el año 2018 se produjeron 2,1 millones de nuevos casos de cáncer de pulmón (11,6 % del total de cánceres) y 1,76 millones de defunciones atribuibles a este tipo de tumor (18,4 % del total de muertes por cáncer), según los datos aportados por la Sociedad Americana de Cáncer.⁴⁶ La Sociedad Española de Oncología Médica también concluye que el cáncer de pulmón continúa siendo la principal causa de muerte por cáncer en nuestro país, con más de 22.000 fallecimientos en 2019.⁴⁷

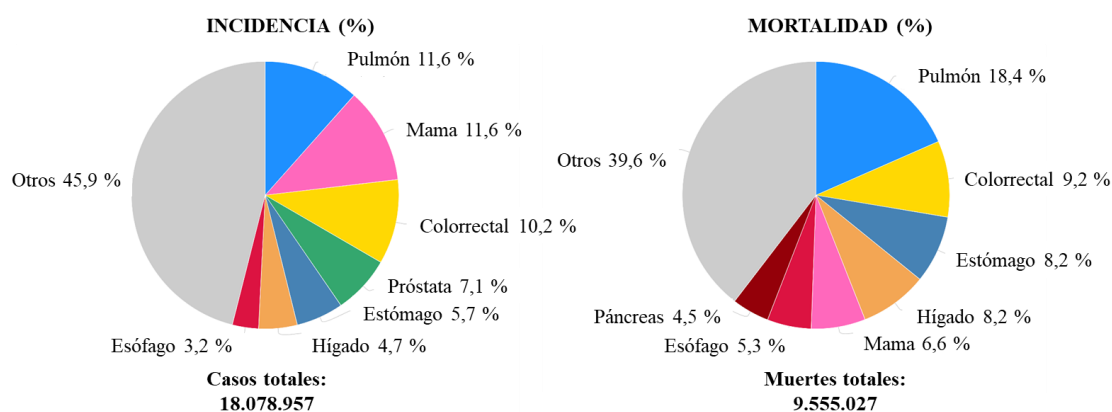


Figura 9. Incidencia y mortalidad de distintos tipos de cáncer a nivel mundial durante el año 2018. Figura modificada de Bray y col., 2018.⁴⁶

Existen dos grandes categorías de cáncer de pulmón: el cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC, del inglés *non-small cell lung carcinoma*) o no microcítico y el carcinoma de pulmón de células pequeñas o microcítico, los cuales representan entre el 75–85 % y el 15–25 %, respectivamente, de todos los casos de cáncer de pulmón. Ambas categorías difieren en la zona del pulmón donde se originan, así como en su capacidad de invasión, respuesta al tratamiento y factores de riesgo implicados en su instauración.⁴⁸ El NSCLC es 9 veces más diagnosticado que el carcinoma microcítico, pero es menos agresivo y metastásico. Dependiendo de su histología, el NSCLC se clasifica en diferentes tipos, siendo el adenocarcinoma (AD) y el carcinoma de células escamosas (SCC) los mayoritarios, y el carcinoma de células grandes y el tumor carcinoide neuroendocrino los minoritarios.

El AD es un tumor epitelial maligno que presenta una diferenciación glandular o mucinosa y que puede mostrar un patrón lepidico, acinar, papilar, micropapilar o sólido con crecimiento de mucina, o bien una combinación de estos patrones.⁴⁸ El AD representa el tipo histológico mayoritario del NSCLC (60 % de los casos) y, comparado con el resto de los tumores pulmonares es de crecimiento más lento.⁴⁸ Este tumor se origina en la periferia pulmonar bajo el revestimiento de los bronquios. Constituye la forma más frecuente de cáncer de pulmón en mujeres y en las personas que nunca han fumado, aunque más del 50 % de los casos diagnosticados de AD corresponden a fumadores.

El SCC es un tumor maligno del epitelio bronquial que puede presentar queratinización, formación de perlas y/o puentes intracelulares.⁴⁸ Representa, aproximadamente, el 25 % de todos los casos de NSCLC.⁴⁸ Se suele localizar en la parte central del pulmón, cerca de las vías respiratorias centrales y en los segmentos bronquiales. Es la forma más frecuente de cáncer de pulmón en hombres y está estrechamente relacionado con el consumo de tabaco ya que el 85–90 % de los pacientes con SCC son fumadores.⁴⁹

El diagnóstico del NSCLC no suele realizarse hasta la aparición de los primeros síntomas, los cuales se generan por los efectos locales del tumor primario o sus metástasis. Entre los síntomas más comunes se encuentran la tos (50–75 % de los pacientes), dolor torácico (20–40 %), ronquera, dificultad respiratoria (25–40 %), pérdida de peso (30–40 %) e infecciones persistentes, tales como bronquitis o neumonía.⁵⁰

El sistema TNM es el método de estadiaje empleado para describir el tamaño de cualquier tipo de tumor, incluido el NSCLC, y si este se ha extendido. Las siglas TNM dan idea del tamaño y ubicación del tumor (T), la afectación o no de los nódulos linfáticos cercanos (N), y la existencia o no de metástasis (M), siendo las localizaciones más comunes de estas metástasis el hígado, los huesos y el cerebro. A continuación de las letras T, N y M aparecen unos números o letras que aportan más información sobre cada uno de estos tres factores. Los números del 0 al 4 indican la gravedad en orden ascendente, por lo que los tumores que presentan números más bajos tienden a tener mejor pronóstico. En conjunto, esta información permite realizar una clasificación global en cinco categorías (0, I, II, III o IV) en orden ascendente a la gravedad del tumor.⁵¹ En esta Memoria de Tesis nos centraremos en el estudio del NSCLC, por ser el de mayor prevalencia.

4.2. Etiología

El tabaco es el principal factor de riesgo del cáncer de pulmón; de hecho, el 90 % de los nuevos casos se detectan en personas fumadoras. Para el conjunto de todos los tumores, solo con la eliminación del hábito tabáquico en la población podrían reducirse el 30 % de nuevos casos. Otros factores de riesgo del cáncer de pulmón son la contaminación ambiental, factores genéticos o alteraciones moleculares, aunque con menor peso en la etiología de la enfermedad.⁵² El riesgo de desarrollar cáncer de pulmón es directamente proporcional a la duración del hábito tabáquico y al grado de consumo de cigarrillos. El tabaco contiene más de 7.000 compuestos químicos, de los cuales 70 son conocidos agentes carcinogénicos, entre los que destacan los hidrocarburos policíclicos aromáticos, las aminas aromáticas o las nitrosaminas.⁵³ Además de los conocidos efectos mutagénicos y citotóxicos de los agentes carcinogénicos, el tabaco también contiene un alcaloide liposoluble, la nicotina, la cual no es solo el principal componente adictivo del tabaco sino que también contribuye al inicio y progresión del cáncer de pulmón mediante la activación de receptores nicotínicos para la acetilcolina (nAChR) expresados en las células tumorales.⁵⁴⁻⁵⁶

Los nAChRs pertenecen a la superfamilia de receptores ionotrópicos activados por ligando, que, históricamente, fueron clasificados como receptores musculares o neuronales, atendiendo al tejido en el que se identificaron por primera vez. El nAChR posee una estructura pentamérica resultante de la combinación de subunidades principales α , las cuales contienen el sitio de unión a acetilcolina (ACh), y subunidades estructurales (β , γ , ϵ). Las subunidades del pentámero,

ensambladas alrededor de un poro iónico central permeable a iones Na^+ , K^+ y Ca^{2+} , se insertan en la membrana celular (Figura 10). La apertura del canal se produce como consecuencia de la unión de ACh, o de agonistas nicotínicos como la nicotina, al dominio N-terminal de la subunidad α .

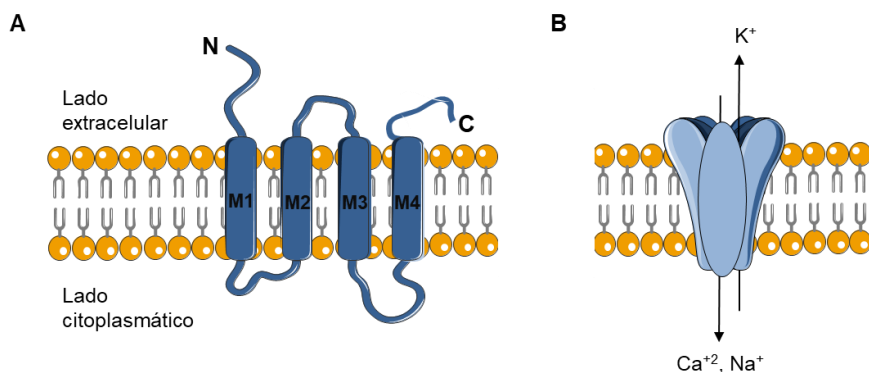


Figura 10. Esquema ilustrativo de la organización estructural de un nAChR típico. A) Estructura terciaria de una subunidad α insertada en la membrana celular con los diferentes dominios que la componen. B) Estructura cuaternaria del receptor constituido por 5 subunidades ensambladas alrededor del poro iónico.

La diferente composición de subunidades que conforma un determinado subtipo de nAChR determina sus características funcionales y farmacológicas. Los subtipos de receptores y las vías de señalización que se ponen en marcha tras la activación del primero por nicotina varían entre células normales y malignas, y van a depender del tipo celular, del estadio del ciclo celular y de las exposiciones ambientales (por ejemplo, al humo de tabaco).⁵⁵ El nivel de expresión de nAChR en las células tumorales también desempeña un papel importante al haberse constatado que la progresión del tumor está asociada con la sobreexpresión de ciertos subtipos de nAChR. Concretamente, el subtipo $\alpha 7$ -nAChR ha mostrado ser el principal desencadenante de la proliferación y de los efectos proangiogénicos y prometastásicos inducidos por nicotina en NSCLC.⁵⁷⁻⁶⁰ La activación del $\alpha 7$ -nAChR por nicotina dispara varias rutas de señalización oncogénicas que, en el caso del NSCLC, involucran las vías MEK/ERK, Akt y Rb-Raf-1/p-ERK/p-p90RSK.^{55, 61} Además, la exposición continuada a la nicotina del tabaco regula al alza la expresión del $\alpha 7$ -nAChR, lo cual exacerba aún más los efectos carcinogénicos del cigarrillo.⁵⁵

4.3. Tratamiento

La terapia actual para el tratamiento del cáncer de pulmón depende del estadio en el que se encuentra el tumor, e incluye cirugía, radioterapia y/o quimioterapia. Para los tumores pequeños y localizados, la resección quirúrgica sigue siendo el tratamiento de elección más exitoso. Sin embargo, casi el 70 % de los casos de cáncer de pulmón se diagnostican cuando están localmente avanzados y/o con enfermedad metastásica; por tanto, en este caso, la radioterapia y la quimioterapia, solas o en combinación, son el abordaje terapéutico de elección.

En el caso concreto del NSCLC localizado, la cirugía es también la primera opción terapéutica; sin embargo, los pacientes sometidos a la resección completa del tumor presentan un elevado riesgo de recidiva. Cuando la quimioterapia se hace necesaria ante un NSCLC avanzado, existen múltiples fármacos que pueden emplearse en monoterapia o combinados. Entre los quimioterápicos más utilizados se encuentran los derivados de platino (cisplatino y carboplatino), los taxanos (paclitaxel y docetaxel), vinorelbina, gemcitabina, etopósido y pemetrexed. En los últimos años, se han producido avances muy significativos en el tratamiento del cáncer de pulmón tras la introducción de nuevas terapias dirigidas a dianas específicas de las células tumorales. Esta terapia dirigida, surgida a raíz de la identificación de mutaciones prevalentes en el cáncer de pulmón, tiene como objetivo mejorar la supervivencia en subgrupos de pacientes con enfermedad metastásica. En el caso del AD, ha sido posible identificar subgrupos de pacientes que poseen mutaciones específicas en genes que codifican componentes del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), de las vías de señalización MAPK y de las fosfatidilinositol-3-cinasas (PI3K). No obstante, a pesar de estos avances terapéuticos, el tratamiento de elección más frecuente para pacientes con NSCLC en la actualidad sigue siendo una combinación de un derivado de platino con otro agente antineoplásico, como etopósido. Otros abordajes terapéuticos novedosos del NSCLC, como la inmunoterapia representada por los anticuerpos dirigidos contra el dominio extracelular de EGFR (cetuximab, matuzumab y panitumumab), o los inhibidores de tirosina cinasa (TKI) (erlotinib y gefitinib) u otras terapias dirigidas, solo han mostrado beneficio en un grupo limitado de pacientes.^{62, 63}

4.3.1. Cisplatino y cáncer de pulmón

El cisplatino es un agente citotóxico alquilante y uno de los agentes anticancerígenos más eficaces. Es ampliamente utilizado en el tratamiento de distintos tumores, como el de ovario, testículo, vejiga, tumor epitelial de cabeza y cuello, cáncer de pulmón y cáncer cervical, entre otros. Este citostático fue sintetizado por M. Peyrone en 1844 y su estructura química elucidada por A. Werner en 1893. Se trata de un complejo con estructura plano-cuadrada con un átomo central de Pt (II) unido a dos átomos de cloro en geometría cis y dos grupos amoniacos.⁶⁴ La captación del fármaco libre por las células se realiza, principalmente, a través del transportador de cobre 1 (CRT1, del inglés *Copper transporter 1*) y, en menor medida, por difusión pasiva.⁶⁵ Intracelularmente, el cisplatino sufre hidratación, desplazando uno o dos aniones Cl⁻, convirtiéndose en un complejo catiónico muy electrófilo capaz de reaccionar con cualquier grupo nucleófilo, como los grupos tiol de las proteínas y los nitrógenos donadores de los ácidos nucleicos que forman el ADN y ARN (Figura 11).⁶⁶

La unión de cisplatino al ADN, al ARN o a otras macromoléculas en dos lugares genera enlaces intra- e intercatenarios. Los enlaces dentro de una misma cadena suponen más del 90 % de la unión del ADN al platino. Estos aductos intracatenarios alteran significativamente la conformación del ADN e inhiben a la ADN polimerasa, ARN polimerasa, la translocación del ARN y otras enzimas clave. Ambos isómeros cis y trans de cisplatino producen entrecruzamiento en el ADN, pero únicamente el isómero cis genera enlaces intracruzados en las células de mamíferos con actividad citotóxica significativa. Otros mecanismos de citotoxicidad del cisplatino incluyen daño mitocondrial, disminución de la actividad ATPasa y alteración de los mecanismos de transporte celular. La citotoxicidad se incrementa con la exposición al fármaco durante la fase S del ciclo celular. El cisplatino provoca la detención del ciclo celular en la fase G2 con lo que se bloquea la mitosis. Por otra parte, el ADN dañado dispara mecanismos de reparación celular, lo cual acaba generando muerte celular programada o apoptosis cuando la reparación resulta infructuosa.^{67, 68}

Entre todos los mecanismos de reparación del ADN, el producido por escisión de nucleótidos parece ser el más activo a la hora de eliminar el cisplatino de su unión a este ácido nucleico. Durante este proceso de reparación, es de destacar el papel desempeñado por la proteína supresora de tumores p53, que es crucial en la regulación de la proliferación y ciclo celular.⁶⁹ Así, tras el reconocimiento del daño al ADN, p53 es fosforilada y, consecuentemente, produce un freno del ciclo celular que permite la reparación del ADN, siempre que el daño de este no sea importante. Si esto último no es el caso, se produce la activación de la apoptosis (Figura 11). Otra vía de señalización activada por el daño infligido al ADN por cisplatino es la de MAPK/JNK/ERK/p38, la cual también induce apoptosis celular.⁷⁰ Por otra parte, tras el daño del ADN producido por cisplatino, la señalización proapoptótica (como la desencadenada por la activación de Bax) aumenta la permeabilización de la membrana externa mitocondrial, liberándose citocromo c, lo que inicia una cascada de activación de caspasas que también inducen apoptosis celular. Es interesante resaltar que las células tumorales en cultivo que se hacen resistentes a cisplatino muestran un umbral para la inducción de la apoptosis por el fármaco más alto, lo cual puede ser debido a una sobreexpresión de proteínas antiapoptóticas o a una deficitaria señalización mitocondrial.⁷¹

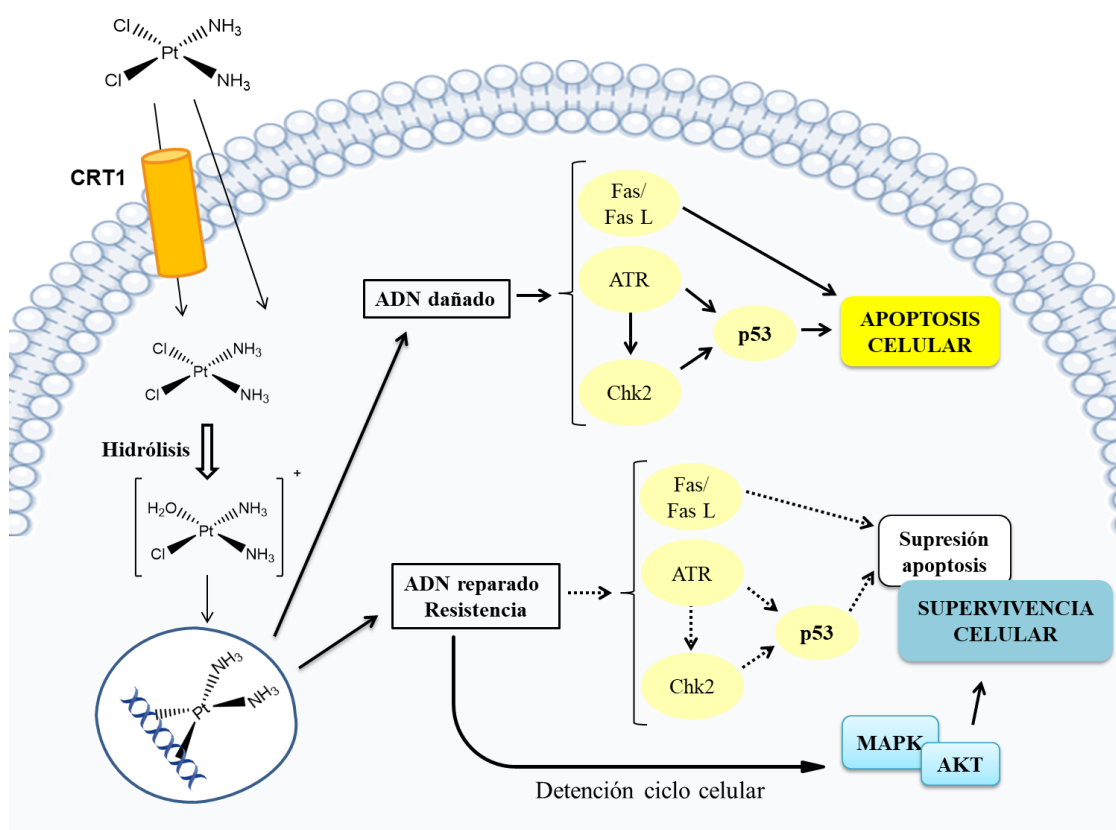


Figura 11. Estructura del cisplatino, captación celular y mecanismos implicados en su efecto citotóxico y en el desarrollo de resistencia a la citotoxicidad del fármaco.

El tratamiento del cáncer de pulmón con cisplatino suele producir importantes efectos adversos, tales como hepatotoxicidad, nefrotoxicidad, cardiotoxicidad, neurotoxicidad y/o hematotoxicidad. Por otra parte, como ocurre en los cultivos de células tumorales, es frecuente que algunos pacientes que responden inicialmente bien al tratamiento con cisplatino, en poco tiempo se vuelvan resistentes al fármaco. Entre los múltiples mecanismos que podrían subyacer en esta quimiorresistencia en pacientes se han propuesto los siguientes: 1) una reducción de la acumulación celular del cisplatino, 2) un aumento del sistema de desintoxicación del fármaco, 3) un incremento de los mecanismos de reparación del ADN, 4) una disminución de la apoptosis y 5) un aumento de la autofagia. Para prevenir la resistencia a los efectos citotóxicos del cisplatino y reducir los efectos secundarios no deseados, se recurre a la terapia combinada del cisplatino con otros fármacos antitumorales, lo cual es una práctica habitual de la mayoría de los tratamientos oncológicos.⁶⁵

Desafortunadamente, a pesar de las mejoras de la técnica quirúrgica y del empleo del tratamiento combinado de fármacos quimioterápicos, el cáncer de pulmón progresa y tiene mal pronóstico. La tasa de supervivencia global de los pacientes con NSCLC a los 5 años tras el diagnóstico se sitúa en torno al 68 % en el estadio IB, o entre el 0–10 % en el estadio IVA-IVB de la enfermedad.⁵¹ En base a todo lo anteriormente expuesto, el descubrimiento de nuevas dianas

terapéuticas implicadas en la progresión tumoral del cáncer de pulmón, así como el desarrollo de nuevos fármacos con mecanismos antitumorales novedosos, constituyen un auténtico reto para la investigación biomédica con el fin de mejorar la calidad de vida y alargar la supervivencia del paciente con cáncer de pulmón.

4.4. PP2A y cáncer de pulmón

Numerosos estudios subrayan la importancia de PP2A como supresor tumoral. La primera evidencia constatando el papel de PP2A sobre la carcinogénesis se obtuvo al observar que el potente y selectivo inhibidor de PP2A, AO, actuaba como promotor tumoral.⁷² PP2A actúa como supresor tumoral a través de la desfosforilación de diversas cinasas implicadas en vías de señalización que promueven el desarrollo del tumor. Una de las vías afectadas por PP2A es la de PI3K/Akt/mTOR que regula la proliferación, migración y supervivencia celular. La fosforilación de Akt (en Thr308 y Ser473) es necesaria para su activación y para la funcionalidad de la anterior vía, mientras que la desfosforilación de Akt por la isoforma de PP2A que contiene la subunidad reguladora B α (PP2A-B α) promueve la apoptosis celular. Por otra parte, PP2A-B' α desfosforila ERK y, de esta manera, se inhibe la activación de la vía de las MAP cinasas.⁷³ Adicionalmente, la desfosforilación de p53 (en Thr55) por PP2A-B' γ secundaria al daño en el ADN conduce a la activación de p53. PP2A también es un regulador maestro de todas las fases del ciclo celular, por lo que contribuye a un correcto mantenimiento de la división celular.⁷⁴

En base a todo lo anterior, se puede concluir que la disminución de la actividad de PP2A es un hallazgo recurrente en muchos tipos de tumores, existiendo diferentes mecanismos por los que esa actividad enzimática se encuentra disminuida o inactivada. Entre esos mecanismos se incluyen los siguientes: mutaciones somáticas, modificaciones postraduccionales (como fosforilación y/o metilación de la cola terminal de la subunidad catalítica), o aumento de expresión de inhibidores endógenos de PP2A.⁷³ Estos mismos mecanismos de inactivación de PP2A han sido revalidados en NSCLC, donde también se constató que el gen que codifica para la subunidad A β de PP2A se encontraba alterado en el 15 % de pacientes con NSCLC.⁷⁵ Además, estudios en animales revelaron que mutaciones en la isoforma A α aumentaban la incidencia de cáncer de pulmón.⁷⁶ En ambos casos, las mutaciones en dichas isoformas provocan una disminución de la unión a otras subunidades de PP2A y, por consiguiente, una disminución en la formación y actividad enzimática de la holoenzima.

La pérdida de actividad de PP2A también puede ser ocasionada por una expresión aberrante de las proteínas endógenas que regulan su actividad. En este sentido, se ha descrito un aumento de expresión de inhibidores endógenos de PP2A, como SET o CIP2A, en NSCLC.⁴³ A mayor expresión de SET en NSCLC, mayor progresión del tumor y peor pronóstico; de hecho, una alta

expresión de SET se correlaciona con estadios tumorales avanzados y metástasis en ganglios linfáticos cercanos. Por tanto, la desregulación de la expresión de SET en NSCLC, a través de la reducción de la actividad antitumoral de PP2A, juega un papel oncogénico clave al promover la proliferación celular, la formación de colonosferas y la invasividad del tumor.³⁸ Por su parte, se ha demostrado que CIP2A promueve la progresión tumoral en varias líneas celulares de NSCLC a través de la activación del eje Akt/mTOR.⁷⁷

PP2A también participa en la regulación de la apoptosis celular a través de la desfosforilación de la proteína proapoptótica Bax, como se expone a continuación. En células sanas, Bax es mayoritariamente una proteína monomérica soluble ya que, a pesar de poseer un dominio hidrófobo C-terminal, este se halla secuestrado dentro de una hendidura hidrofóbica. Sin embargo, en respuesta a ciertos estímulos, Bax sufre un cambio conformacional que promueve su traslocación en la membrana mitocondrial, exponiendo el dominio hidrofóbico C-terminal al citosol. Como resultado de dicha traslocación, Bax formará grandes oligómeros que se insertan en la membrana mitocondrial, lo cual conducirá a la liberación del citocromo c, promoviendo así la apoptosis. La nicotina, a través de la activación de su cinasa fisiológica Akt, induce la fosforilación de Bax (en Ser184, localizada en su cola hidrofoba C-terminal). Dicha fosforilación compromete la formación de oligómeros y, por tanto, inactiva a Bax en neutrófilos y células tumorales de pulmón humano (Figura 12).⁷⁸ A través de la interferencia con Bax y la activación de rutas de supervivencia (como Akt y ERK1/2), la nicotina del tabaco disminuye el efecto terapéutico (resistencia) de diversos agentes antineoplásicos en cáncer de pulmón, incluido el cisplatino.⁷⁹ Esta resistencia a cisplatino inducida por nicotina podría ser revertida por PP2A a través de la desfosforilación de la proteína proapoptótica Bax y de las proteínas de supervivencia celular Akt y ERK1/2 al favorecer la actividad proapoptótica celular.^{80, 81}

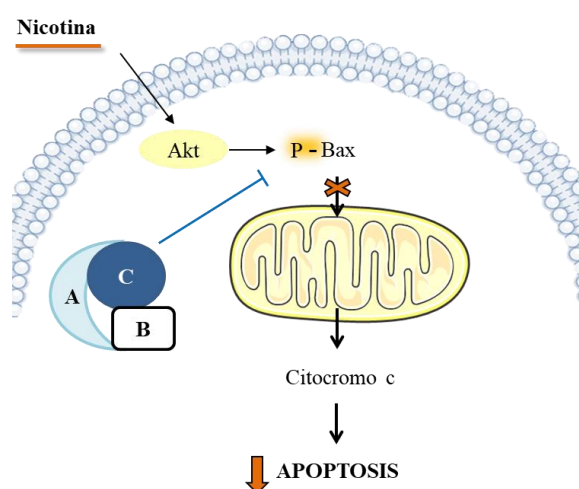


Figura 12. Efectos contrapuestos de nicotina y PP2A sobre la apoptosis celular a través de Bax. Nicotina, a través de Akt, provoca la fosforilación de Bax, hecho que impide su inserción en la membrana mitocondrial y una disminución de la apoptosis celular. PP2A, mediante la desfosforilación de Bax, previene el efecto antiapoptótico de nicotina.

5. ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

5.1. Introducción

Alrededor de 50 millones de personas padecen demencia en todo el mundo, con casi 10 millones de nuevos casos diagnosticados cada año. La proporción estimada de la población general de 60 o más años con demencia está entre el 5 y 8 %. Se prevé que el número total de personas con demencia alcanzará los 82 millones en 2030 y los 152 millones en 2050. Dada su alta prevalencia y el alto coste social y económico que supone, la demencia es reconocida por la OMS como una prioridad de Salud Pública desde el año 2012. En 2017, la Asamblea Mundial de la Salud aprobó un Plan de Acción Mundial como respuesta de Salud Pública a la demencia durante el periodo 2017–2025.⁸²

La demencia es un síndrome neurodegenerativo causado por una serie de alteraciones cerebrales que afectan a la memoria, la función cognitiva, el comportamiento, la habilidad de desempeñar las actividades cotidianas y las emociones. La EA es la forma de demencia más común y constituye el 60–70 % de los casos. Otras formas frecuentes de demencia son la demencia vascular, la demencia con cuerpos de Lewy y un grupo de enfermedades que contribuyen a la demencia frontotemporal. Actualmente no existe ningún tratamiento capaz de curar o detener el avance de todos estos tipos de demencia.⁸³

La EA es la enfermedad neurodegenerativa más frecuente. Debe su nombre al patólogo y neurólogo alemán Alois Alzheimer, quien en 1901 identificó el primer caso en una mujer de 51 años llamada Auguste Deter. Tras el fallecimiento de la paciente y durante una reunión de psiquiatría en 1906, el Dr. Alzheimer presentó las características histológicas encontradas al examinar el cerebro *post mortem*: placas seniles y ovillos neurofibrilares (NFT, por sus siglas en inglés *neurofibrillary tangles*). Un año después, el Dr. Alzheimer publicó estas observaciones describiendo, por primera vez, las características de la enfermedad en el artículo “*Sobre un proceso patológico peculiar grave de la corteza cerebral*”.⁸⁴

El principal síntoma de la EA es una demencia progresiva, que comienza con una sutil pérdida de memoria y desorientación espaciotemporal. En una segunda fase, el enfermo pierde fluidez en el lenguaje y precisa ayuda para realizar actividades cotidianas. En la fase avanzada, la incapacidad es absoluta, no reconoce a sus allegados, deja de hablar y aumenta la rigidez muscular de manera que queda recluido a una silla de ruedas o encamado. Otros síntomas comunes son alteraciones en el comportamiento, como la agitación, la agresividad, la apatía o la depresión, culminando en la muerte prematura del paciente (Figura 13).⁸³ Existe correlación entre las etapas clínicas y el desarrollo gradual de los cambios observados en el cerebro, según lo establecido por Braak y Braak y, una vez que comienza el proceso de degeneración, este es irreversible.⁸⁵



Figura 13. Fases del desarrollo de la EA.

El proceso neurodegenerativo de la EA comienza años antes de que aparezcan los primeros síntomas. La alteración patológica cerebral se identifica por la presencia de dos tipos de lesiones histopatológicas características: placas seniles extracelulares y NFT intracelulares, ambos asociados a muerte neuronal y pérdida de sinapsis. En el fenotipo más frecuente, la neurodegeneración se inicia en la corteza entorrinal y en el hipocampo, así como en otras estructuras relacionadas con el lóbulo temporal medio, extendiéndose progresivamente hacia áreas de asociación neocortical, siendo las neuronas colinérgicas las más vulnerables.^{85, 86}

El diagnóstico actual de la EA se basa en el estudio de la historia médica y familiar del individuo y en la realización de pruebas cognitivas, físicas y neurológicas que descarten otros tipos de demencias, ya que no existen marcadores diagnósticos específicos de la enfermedad.⁸³

5.2. Etiología

Los enfermos con EA se distribuyen en dos grupos, según presenten la forma esporádica o familiar. La EA esporádica es mayoritaria (>90 %) y se caracteriza por tener una etiología desconocida, una aparición tardía (personas mayores de 65 años) y una progresión desde una intensidad moderada hasta grave. La EA familiar puede aparecer tempranamente (a partir de los 30 años), siendo su progresión mucho más rápida y grave. Esta forma de la enfermedad está ligada a mutaciones en genes que codifican para diferentes proteínas implicadas en la etiopatogenia de la enfermedad, siendo el factor genético de mayor riesgo el alelo $\epsilon 4$ del gen APOE.^{83, 87}

El principal factor de riesgo que desencadena la aparición de la enfermedad es el envejecimiento. Así, el 90 % de las personas con EA tienen más de 65 años y la prevalencia de la enfermedad aumenta dramáticamente con la edad, siendo de un 3 % en personas de entre 65 y 74

años, un 17 % a los 75–84 años y un 32 % en mayores de 85 años. Es importante tener en cuenta que la demencia no es una patología consustancial con el envejecimiento. Otros factores de riesgo que se correlacionan con la aparición de la enfermedad son la diabetes, la obesidad, la inactividad física y mental, la depresión o el tabaco.⁸³

A pesar de los importantes avances realizados en diferentes ámbitos de las ciencias biomédicas, como la genética, la biología molecular o la farmacología, la causa de la EA sigue siendo una incógnita desde que hace más de 100 años Alzheimer describiese la enfermedad. No obstante, está ampliamente aceptado que la EA, al igual que otras enfermedades neurodegenerativas, es un proceso multifactorial con varios procesos patológicos implicados. Entre estos procesos, cabe destacar el procesamiento aberrante del péptido β -amiloide (β A), la hiperfosforilación de la proteína tau, la desregulación del Ca^{2+} neuronal, la disfunción mitocondrial, el estrés oxidativo y la neuroinflamación.⁸⁸ A lo largo de los años se han propuesto diversas teorías que tratan de explicar las causas de la enfermedad, centrando los esfuerzos terapéuticos en la intervención farmacológica. Las principales hipótesis estudiadas en las últimas cuatro décadas se resumen a continuación.

5.2.1. Hipótesis colinérgica

Esta hipótesis surgió de la observación realizada por Bartus y col. sobre una pérdida significativa de neuronas en el sistema colinérgico en cerebros de pacientes de EA. Los autores encontraron que los niveles cerebrales del neurotransmisor ACh, así como los niveles de la enzima responsable de su síntesis, la colinacetiltransferasa, se encontraban claramente disminuidos.⁸⁹ También apreciaron deficiencias a nivel presináptico en los sistemas de liberación de ACh⁹⁰ y recaptación de colina,⁹¹ y reducción en la densidad de receptores nicotínicos.⁹² Dada la implicación de la ACh y el sistema de neurotransmisión colinérgico nicotínico en los procesos de aprendizaje y memoria, los anteriores autores postularon que la disminución en la función colinérgica neuronal se traduciría en una pérdida de memoria a medida que avanzaba el proceso neurodegenerativo.^{89, 93}

Aunque la hipótesis colinérgica es cierta, otros sistemas de neurotransmisión también se encuentran alterados en la EA, como el glutamatérgico.⁹⁴ Se ha observado una pérdida significativa de neuronas glutamatérgicas, así como alteraciones en la expresión de los receptores de *N*-metil-D-aspartato (NMDA) y de ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilisoxazol-4-propiónico (AMPA) en la corteza cerebral e hipocampo de pacientes de EA.⁹⁴ Por otra parte, tras la muerte neuronal, el glutamato liberado al espacio extracelular incrementa la frecuencia de despolarización de la membrana postsináptica, lo cual altera la neurotransmisión fisiológica mediada por receptores NMDA y, en consecuencia, contribuye a la muerte por excitotoxicidad.⁹⁵

5.2.2. Hipótesis amiloide

En 1992, Hardy y Higgins postularon la hipótesis de la cascada amiloide basada en la observación de la acumulación del péptido β A en el cerebro de pacientes de EA. De acuerdo a esta hipótesis, las placas seniles, formadas fundamentalmente por la agregación de dicho péptido, desencadenan una cascada patológica que incluye la formación de NFT, la muerte neuronal, el daño vascular y la consiguiente demencia.^{96, 97}

En este contexto, la proteína precursora de amiloide (APP, por sus siglas en inglés *amyloid precursor protein*) es una glucoproteína transmembrana altamente expresada en el cerebro. En condiciones fisiológicas, APP parece estar involucrada en la sinaptogénesis, la maduración, la diferenciación y la viabilidad neuronal.⁹⁸ Existen dos rutas posibles para el procesamiento proteolítico de la APP. En la ruta no amiloidogénica, la APP se metaboliza rápidamente por la α -y γ -secretasa, cuyo centro catalítico está formado por las presenilinas 1 y 2 (PSEN-1 y PSEN-2), dando lugar a una forma soluble de la APP que presenta propiedades neuroprotectoras. Por el contrario, en la ruta amiloidogénica, la APP se escinde por la acción inicial de la enzima β -secretasa (BACE-1, por sus siglas en inglés *beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1*) seguida de la γ -secretasa, liberando finalmente el péptido β A, formado por entre 36 y 43 aminoácidos.⁹⁹ El papel fisiológico del β A parece estar relacionado con la prevención de una hiperactividad neuronal al disminuir la transmisión excitatoria.¹⁰⁰ Mutaciones autosómicas dominantes en genes que codifican la APP, la PSEN-1 y la PSEN-2 dan lugar a una producción anómala de β A y son las causantes de los casos familiares de EA.¹⁰¹

El monómero de β A formado por 42 aminoácidos (β A₁₋₄₂) es el que más tendencia tiene a autoagregarse, formando oligómeros, fibrillas y finalmente las placas seniles insolubles características de la EA.¹⁰² Todo este suceso de eventos conduce a una activación local de la microglía, liberación de citocinas, astrocitosis reactiva y respuesta inflamatoria,¹⁰³ así como a una disfunción mitocondrial y desregulación de la concentración intracelular de Ca^{2+} que, en última instancia, provoca la muerte neuronal.¹⁰⁴

Sin embargo, no se ha detectado una correlación lineal entre las placas de β A y el deterioro cognitivo. La acumulación de β A es un evento temprano que comienza 15–20 años antes del inicio de los síntomas. Por ello, muchos autores defienden que el β A es el iniciador de otras alteraciones patológicas que subyacen en la EA, como la hiperfosforilación y la agregación de la proteína tau, que son los que finalmente median la neurodegeneración.¹⁰⁵

5.2.3. Hipótesis tau

La proteína tau forma parte importante del citoesqueleto de las neuronas, donde desempeña un papel clave en el ensamblaje y estabilización de los microtúbulos. Adicionalmente, esta proteína participa en otros eventos fundamentales para la correcta actividad neuronal, incluyendo la regulación del transporte axonal de nutrientes, la neurogénesis o la regulación de varias rutas de señalización hacia el interior neuronal.¹⁰⁶ Tau también juega un papel importante en la plasticidad sináptica y, por tanto, en los procesos de aprendizaje y la memoria.¹⁰⁷

La proteína tau fue aislada por primera vez en 1975.¹⁰⁸ Se expresa principalmente en neuronas y está codificada por el gen MAPT, situado en el cromosoma 17, del que existen seis isoformas en el cerebro adulto.¹⁰⁹ Estructuralmente, tau es una fosfoproteína altamente soluble que muestra poca tendencia a la agregación, localizándose de forma predominante en los axones de las neuronas. Alteraciones en sus valores normales de fosforilación son la causa común de un grupo de enfermedades neurodegenerativas denominadas taupatías, entre las que se encuentra la EA. La hiperfosforilación de tau provoca la pérdida de afinidad por los microtúbulos y promueve la autoagregación en pares de filamentos helicoidales (PHF, por sus siglas en inglés *paired helical filaments*) y filamentos rectos que, al acumularse, forman los NFT, los cuales son insolubles en el medio celular y se depositan, principalmente, en el soma neuronal (Figura 14).

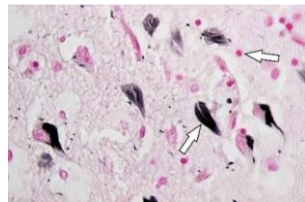


Figura 14. Placas amiloides (rosa) y ovillos neurofibrilares (negro) en tejido cerebral de la EA. Imagen tomada de www.alzheimers.org.uk.

No obstante, tau puede aparecer también en el espacio extracelular debido principalmente a su extrusión celular por un mecanismo exocitótico. Dependiendo de su estado de agregación, la proteína tau extracelular puede ser internalizada en las células vecinas por al menos dos mecanismos diferentes. Así, en el caso de monómeros solubles y oligómeros pequeños, se produce un proceso de endocitosis dependiente de clatrina.¹¹⁰ Por el contrario, los agregados más grandes se unen a la heparina de la matriz extracelular para ser internalizados por macropinocitosis.¹¹¹ Esta propagación de tau de carácter priónico ha sido demostrada en varias taupatías, incluida la EA.

En la EA, se ha observado un incremento en los niveles de la proteína tau cerebral,^{112, 113} además de un aumento de las modificaciones postraduccionales de tau, entre las que destaca la hiperfosforilación que conduce a la toxicidad (Figura 15).¹¹⁴

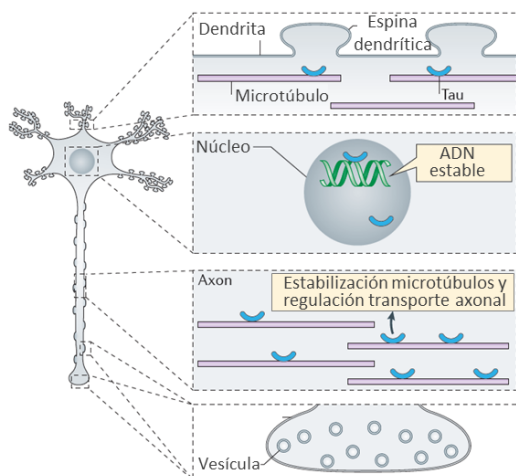
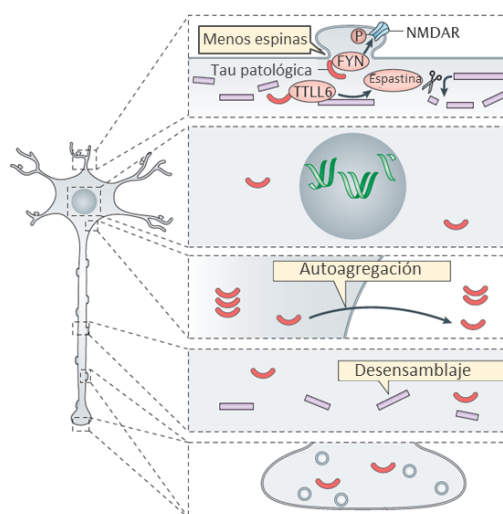
A Tau en condiciones fisiológicas**B Tau en condiciones patológicas**

Figura 15. Funciones neuronales de la proteína tau en condiciones fisiológicas y patológicas. Modificada de Wang y col., 2015.¹¹⁵

En condiciones fisiológicas, la proteína tau contiene 2 moles de fosfato por cada mol de proteína, mientras que en la EA puede incrementarse hasta a 8 moles de fosfato por cada mol de proteína.¹¹⁶ En la EA, la proteína tau puede ser fosforilada hasta en 38 residuos diferentes de Ser y Thr. Esta hiperfosforilación patológica de tau es el resultado de un desbalance entre la actividad de las cinasas de tau, que se encuentra aumentada, y la de sus fosfatasas, que se encuentra disminuida.¹¹⁷ Son múltiples las cinasas involucradas en la fosforilación de tau *in vivo*: la cinasa glucógeno sintasa 3 β (GSK-3 β), la cinasa dependiente de ciclina 5 (Cdk-5), la proteína cinasa A (PKA), la proteína cinasa dependiente de calcio y calmodulina II, la caseína cinasa 1, las MAP cinasas (entre las que destaca ERK1/2) y las proteínas cinasas activadas por estrés.¹¹⁸ Todas estas cinasas se han encontrado asociadas a NFT en cerebros de pacientes de EA, siendo Cdk-5 y GSK-3 β las más relevantes.¹¹⁹ Para llevar a cabo la fosforilación en los aminoácidos clave que inducen la disociación de tau y su agregación se requiere, al menos, la participación de dos cinasas.¹²⁰ Por el otro lado, las fosfatasas PP2A y PP1 son responsables del 82 % de la desfosforilación de tau.¹²¹

Las modificaciones postraduccionales observadas en la proteína tau cerebral de los pacientes con EA impiden su correcta degradación por las calpaínas, las proteasas activadas por calcio o a través del proteosoma. Por ello, los niveles de proteína tau hiperfosforilada en sujetos enfermos pueden llegar a ser siete veces superiores a los encontrados en controles sanos.^{122, 123}

A medida que la EA va progresando, la propagación de la taupatía avanza desde la región entorrinal hacia las áreas límbicas continuando hasta la neocorteza, mientras que la progresión de la patología amiloide exhibe la propagación opuesta.⁸⁵ Con respecto al curso temporal, la patología tau precede a la amiloide, de acuerdo con el estudio de Braak y col..¹²⁴ Otro hallazgo

significativo es que ciertas mutaciones en el gen MAPT causan demencia fronto-temporal, lo que demuestra que la disfunción de tau es causa suficiente para provocar neurodegeneración y demencia clínica en ausencia de patología amiloide. Por el contrario, la toxicidad de β A requiere la implicación de tau,¹²⁵ tal como se deduce del hecho de que existan personas con patología amiloide avanzada asintomáticos para la EA.¹²⁶

5.3. Tratamiento

En la actualidad, no existe un tratamiento capaz de detener o revertir la EA. La tacrina, un inhibidor de enzimas colinesterasas, fue el primer medicamento aprobado en 1993 para tratar esta enfermedad, siendo posteriormente retirado del mercado en 2013 por su hepatotoxicidad.¹²⁷ Actualmente, existen cuatro fármacos aprobados para el tratamiento de la EA: los inhibidores de acetilcolinesterasa donepezilo, rivastigmina y galantamina, cuyo principal mecanismo de acción consiste en aumentar los niveles de ACh en la hendidura sináptica de las terminaciones nerviosas colinérgicas centrales, evitando su atrofia funcional, y el antagonista del receptor de NMDA memantina, en línea con la modulación de la neurotransmisión glutamatérgica (Figura 16).

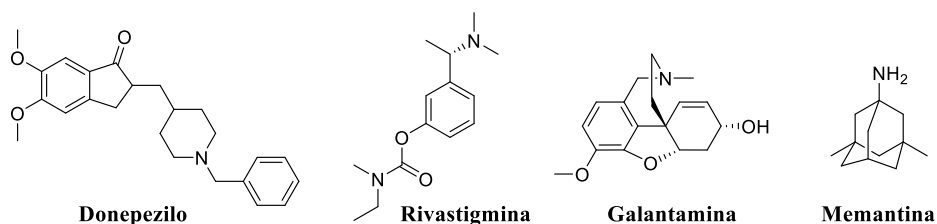


Figura 16. Estructura química de los fármacos disponibles actualmente en la terapéutica de la EA.

Estos fármacos son considerados, fundamentalmente, como tratamientos sintomáticos de la EA, ya que solo tienen capacidad para reducir sutilmente el deterioro cognitivo y los síntomas neuropsiquiátricos característicos de la enfermedad. Los inhibidores de acetilcolinesterasa tienden a estabilizar la función cognitiva y la capacidad de desempeñar las funciones cotidianas durante el primer año de tratamiento en los casos de EA leve a moderada, mientras que, en los casos moderados o graves, la memantina en monoterapia, o como coadyuvante a los inhibidores de acetilcolinesterasa, tiene un cierto efecto paliativo del deterioro cognitivo.⁹⁴

Desafortunadamente, la mayoría de los pacientes no responden adecuadamente al anterior tratamiento. Desde 2003, año en el que se aprobó la memantina, ningún otro fármaco ha sido comercializado para la EA. Algunos ejemplos recientes de fracaso en ensayos clínicos en fase III para posicionar nuevas terapias en la EA son el solanezumab y CNP520 (umibecestat). Los estudios con solanezumab, un anticuerpo monoclonal dirigido a la región central de β A en pacientes con EA leve a moderada, demostraron que la carga amiloide no disminuyó en

comparación con la del grupo control (placebo), por lo que el ensayo clínico fue cancelado en 2016. Un ensayo clínico con pacientes que presentaban mutaciones en el alelo $\epsilon 4$ del gen APOE y placas amiloides, pero sin déficit cognitivo, tratados con CNP520, un inhibidor de BACE-1, fue suspendido en 2019 por empeoramiento de la función cognitiva de los participantes.¹²⁸

La dificultad para encontrar un nuevo tratamiento en la EA podría deberse a varias causas, incluida la complejidad anatómica y funcional del sistema nervioso central (SNC), el desconocimiento del mecanismo preciso que origina la enfermedad, la ausencia de biomarcadores que muestren la evolución de la patología, o la ausencia de modelos animales validados.¹²⁹ Durante las últimas dos décadas, la comunidad científica ha centrado los esfuerzos investigadores hacia la patología amiloide, incluyendo el desarrollo de anticuerpos monoclonales, inhibidores de γ -secretasa y β -secretasa o fármacos antiagregantes. No obstante, aunque la carga amiloide parece disminuir en pacientes de EA con estas últimas intervenciones, los resultados cognitivos siguen siendo desalentadores, por lo que es necesario encontrar nuevas dianas y nuevos abordajes terapéuticos eficaces para combatir la enfermedad.¹²⁸

5.4. PP2A y enfermedad de Alzheimer

Como se ha comentado, PP2A y PP1 juegan un papel fundamental en la regulación del estado de fosforilación de la proteína tau.¹⁴ Los altos niveles de expresión en cerebro de las dos isoformas de la subunidad C y la expresión específica de ciertas isoformas de la subunidad B (B/PR55 y B'/PR61), sugieren que PP2A es clave para una adecuada función neuronal. En neuronas, PP2A parece estar dirigida a ubicaciones intracelulares específicas, como los neurofilamentos, sobre los que también regula su estado de fosforilación, lo que influye en su estabilidad, y la interacción con otros componentes del citoesqueleto.²¹ PP2A es la principal fosfatasa responsable de la desfosforilación de tau, llevando a cabo más del 71 % de la actividad total (Figura 17).¹²¹ En concreto, PP2A-B α es la principal isoforma implicada en desfosforilar tau, colocalizando con los microtúbulos y con tau, uniéndose a ambos por distinto sitio, con lo que la enzima actúa como nexo entre tau y el citoesqueleto. La isoforma de PP2A que contiene la subunidad B'' también puede asociarse a microtúbulos, no así otras isoformas. Otras Ser/Thr fosfatasas que también participan en la desfosforilación de tau son PP1, PP5 y Cn, las cuales son responsables del 11, 10 y 7 %, respectivamente, de la actividad fosfatasa total sobre tau en cerebro humano (Figura 17).¹²¹ De los más de 30 aminoácidos que pueden incorporar un grupo fosfato en tau, solo la fosforilación en Thr231, Ser262, Thr181, Ser199, Ser202, Thr212, Ser396, Thr403 y Ser404 provoca una pérdida de afinidad por los microtúbulos y su disociación. PP2A desfosforila todos ellos a excepción de Thr212 y Ser396, sobre los que actúa preferentemente PP1 y Cn.¹²¹

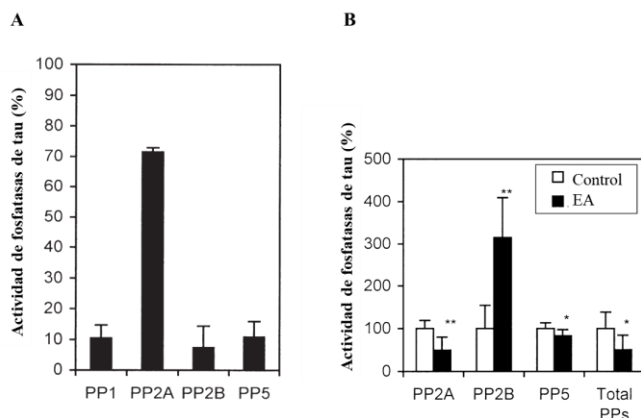


Figura 17. A) Actividad enzimática normalizada de cada tipo de fosfatasa sobre la proteína tau en cerebros humanos. B) Comparación de la actividad de las fosfatasas de tau en cerebros sanos (control) y de pacientes con EA. Imagen adaptada de Liu y col., 2005.¹²¹

Se ha propuesto que la hiperfosforilación de tau en cerebros de pacientes de EA se debe, en parte, a una reducción del 50 % de la actividad fosfatasa cerebral total, especialmente en corteza e hipocampo. En concreto, la actividad de PP2A en cerebros de pacientes de EA se encuentra reducida en un 50 % respecto a sujetos sanos, mientras que PP1 y PP5 merman su actividad en un 20 % (Figura 17). La pérdida de actividad de PP2A se ha atribuido a una disminución en su expresión proteica, al aumento de inhibición de su actividad o a alteraciones en su especificidad y localización subcelular. De hecho, se ha demostrado que los niveles de RNA mensajero y expresión proteica de PP2Ac están disminuidos en cerebros de pacientes de EA.¹³⁰ ¹³¹ Los déficits en la expresión génica también afectan a la subunidad B α , cuya disminución en la corteza frontal y temporal se correlaciona con la patología tau en pacientes de EA.¹³¹

Con respecto a las modificaciones postraduccionales de PP2A, ha sido descrito que la metilación de PP2Ac en Leu309 está muy disminuida en la EA debido tanto a un aumento de la actividad de PME-1, como a la disminución de la actividad de LCMT-1. En consecuencia, se produce la inactivación de PP2A y la pérdida de afinidad de la subunidad B α , la responsable de la desfosforilación de tau.¹³² Además, esta deficitaria metilación de PP2A y su consecuente pérdida de actividad fosfatasa favorece el aumento de actividad de las c-jun *N*-terminal cinasas (JNKs). Estas cinasas controlan el proceso apoptótico y han sido señaladas como las responsables del disparo de las señales de muerte neuronal observadas en diversas enfermedades neurodegenerativas, incluida la EA.¹³³ Además, se ha encontrado un aumento de la fosforilación de PP2Ac en Tyr307, que también reduce su actividad.¹³⁴

En relación a los inhibidores endógenos de PP2A, I₁^{PP2A} y SET, estos se encuentran aumentados un 20 % en cerebros de pacientes con EA. Más aún, SET está aumentado en el citosol debido a su traslocación desde el núcleo.¹³⁵ Recientemente, se ha demostrado que CIP2A también

está sobreexpresado en cerebros de pacientes con EA.⁴⁴ La sobreexpresión *in vivo* de estos inhibidores endógenos produce hiperfosforilación de tau, pérdida de dendritas, alteraciones en los marcadores sinápticos y déficits en los test de comportamiento espacial y memoria.^{44, 136, 137}

A la vista de los hallazgos anteriores, no existe un consenso claro sobre los mecanismos principales que promueven la inactivación de PP2A en la EA. En cualquier caso, ha sido ampliamente estudiado que el AO, mediante la inhibición de PP1 y PP2A, desencadena características propias de la EA, tanto *in vitro* como *in vivo*, causando hiperfosforilación de tau.¹³⁸

El amplio abanico de procesos celulares regulados por PP2A hace pensar que cualquier disfunción de su actividad deberá tener consecuencias negativas para el buen funcionamiento de todos estos procesos. La inhibición de PP2A, además de ser crítica para la hiperfosforilación de tau, parece acelerar la formación de depósitos extracelulares de β A. Este efecto parece deberse a que la disminución de la actividad de PP2A aumenta la fosforilación de APP en Thr668 favoreciendo la generación de β A y, en consecuencia, la formación de las placas amiloides.^{139, 140}

PP2A también interacciona con el receptor NMDA para glutamato, otra diana validada en la EA. Los receptores de NMDA están formados por dos subunidades, NR1 y NR2, y a veces NR3. PP2A se encuentra constitutivamente asociada a este complejo proteico, donde desfosforila la Ser897 de la subunidad NR1, lo que provoca una disminución de la entrada de Ca^{2+} a través del receptor. En la EA, el receptor de NMDA se encuentra en un estado de sobreactivación, lo cual produce la disociación de PP2A y el consiguiente incremento de entrada de Ca^{2+} por el ionóforo (Figura 18).¹⁴¹ Por su parte, PP1 regula la fosforilación de la subunidad NR2 del receptor NMDA, proceso por el que también se reduce la entrada de Ca^{2+} a través del receptor.¹⁴²

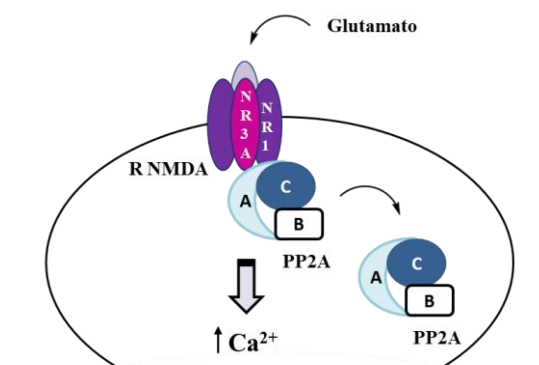


Figura 18. Comunicación entre el receptor NMDA y PP2A. Imagen adaptada de Taleski y col., 2017.¹⁴³

Por último, ha sido ampliamente demostrado que el estrés oxidativo modula múltiples componentes de PP2A, aunque la mayoría de los estudios se centran en su subunidad catalítica. Independientemente de la etiología subyacente, la atenuación de la actividad de PP2A mediada por radicales libres parece ser un mecanismo común ante el aumento del estrés oxidativo.^{144, 145}

6. MODULACIÓN FARMACOLÓGICA DE PP2A

Dado el papel clave de PP2A en la regulación de muchos procesos celulares, así como en la etiopatogenia de diversas enfermedades, se han diseñado hasta la fecha varios abordajes experimentales para modular farmacológicamente la actividad de esta fosfatasa. A grandes rasgos, estos abordajes son los siguientes:

1. **Compuestos dirigidos a activar directamente a PP2A.** Si bien la mayoría de las terapias en la actualidad modulan la actividad de PP2A de manera indirecta, se han identificado pequeñas moléculas, como las fenotiazinas, que actúan como activadores directos de esta enzima. Los primeros activadores descubiertos fueron aminas básicas, como la protamina y la polilisina, que se encuentran cargadas positivamente a pH fisiológico y son capaces de aumentar la actividad de PP2A mediante su interacción con la subunidad C.¹⁴⁶ Recientemente, Sangodkar y col. han identificado una sulfonamida tricíclica sintética, denominada SMAP (del inglés *small-molecule activator of PP2A*) capaz de activar PP2A (Figura 19).¹⁴⁷ Más aún, estos autores demuestran que dicha molécula inhibe la progresión tumoral del cáncer de pulmón con mutación de KRAS en xenoinjertos de ratón y modelos transgénicos mediante la unión a la subunidad A α de PP2A, lo cual provoca muerte celular e interrupción de la progresión tumoral a través de la inhibición de la vía de señalización de MAPK.¹⁴⁷

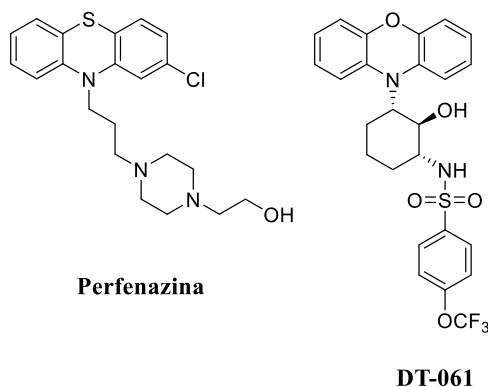


Figura 19. Estructura química de una fenotiazina (perfenazina) y uno de los compuestos SMAP (DT-061) descrito por Sangodkar y col., 2017.¹⁴⁷

2. **Compuestos dirigidos a los inhibidores endógenos de PP2A.** Se ha descrito ampliamente que antagonizar la acción de los inhibidores endógenos de PP2A tiene efectos antitumorales, tanto *in vitro* como *in vivo*.^{35, 37, 148} El descubrimiento de moléculas pequeñas antagonistas de inhibidores de PP2A, específicamente de SET y CIP2A, ha proporcionado información sobre los mecanismos de desregulación de PP2A en cáncer y supone una potencial y prometedora vía terapéutica.

2.1. Inhibidores de SET. En la búsqueda de nuevas moléculas para el tratamiento de cáncer que interfieran con la interacción PP2A/SET, las ceramidas, un tipo de esfingolípidos producidos por la célula, así como sus derivados, han sido algunas de las moléculas más ensayadas.¹⁴⁹ Entre las moléculas dirigidas a SET se encuentran las siguientes:

- Fingolimod (FTY720) es un análogo sintético de esfingosina aprobado por la FDA para el tratamiento de la esclerosis múltiple, por su efecto activador de receptores de esfingosina 1-fosfato (S1P) induciendo un efecto inmunosupresor (Figura 20). Además, FTY720 es un potente activador de PP2A capaz de unirse al dominio de SET implicado en la unión con PP2Ac, provocando tanto la disociación del inhibidor como su traslocación al núcleo. FTY720 ha demostrado ser efectivo en múltiples modelos preclínicos de cáncer, incluidos la leucemia, colon, NSCLC, mama, carcinoma hepatocelular y próstata, entre otros.¹⁵⁰ Algunos derivados de FTY720, como MP07-66 y OSU-2S (Figura 20), también presentan efectos antitumorales equivalentes a los del compuesto original.^{151, 152}

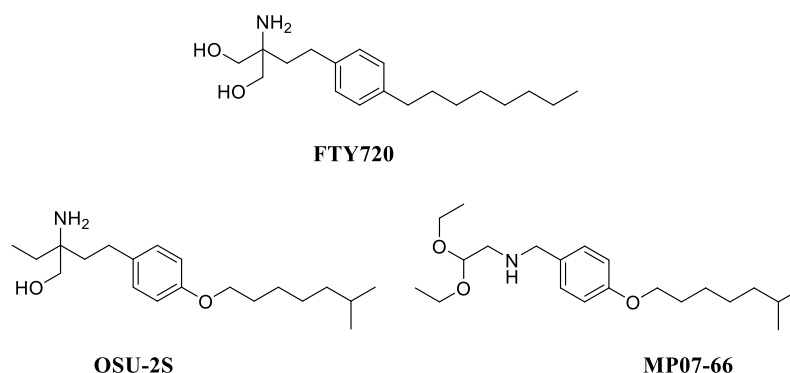
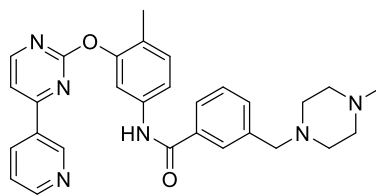


Figura 20. Estructura química de FTY720 y algunos de sus derivados.

- Peptidomiméticos de la apolipoproteína E. Estos compuestos, como COG112 y COG449 (OP449), al unirse a SET, impiden la interacción entre SET y PP2A, lo cual se traduce en un incremento de la actividad de PP2A.^{153, 154} En estudios preclínicos de modelos de distintos tipos de cáncer, incluida la leucemia aguda, el cáncer de mama y el de próstata, OP449 ha demostrado poseer un efecto antitumoral.^{148, 154, 155}
- TGI1002 es una molécula pequeña (Figura 21) capaz de interrumpir la interacción entre SET y PP2A y aumentar la actividad de PP2A *in vitro*. Ha demostrado poseer acción antitumoral *in vivo* en leucemia mieloide crónica.¹⁵⁶



TGI1002

Figura 21. Estructura química de TGI1002.

2.2. Inhibidores de CIP2A. El mecanismo de inhibición de PP2A por CIP2A no está bien aclarado, aunque algunos autores sugieren que CIP2A se une a PP2Ac alostéricamente en su interfase de unión con la subunidad B, alterando así la especificidad del sustrato y/o limitando la actividad.¹⁵⁷ Entre las moléculas que interfieren con CIP2A se encuentran:

- Bortezomib es un inhibidor del proteosoma que produce la interrupción del ciclo celular y de la apoptosis (Figura 22). Su uso está aprobado por la FDA para el tratamiento del mieloma múltiple y del linfoma de células del manto.¹⁵⁸ Además, bortezomib regula negativamente la expresión postraduccional de CIP2A por un mecanismo aún desconocido, lo cual supone un incremento de actividad de PP2A en múltiples tipos de cáncer, como el carcinoma hepatocelular, el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello y el cáncer de mama.¹⁵⁹⁻¹⁶¹
- Celastrol es un triterpenoide pentacíclico (Figura 22) que se une directamente a CIP2A y lo secuestra mediante la formación de un complejo dirigido a la vía de degradación del proteosoma de ubiquitina, según se ha podido constatar en un modelo animal de NSCLC. De esta manera, el celastrol produce disminución de la expresión de CIP2A promoviendo la apoptosis celular y la supresión del crecimiento tumoral en modelos murinos.¹⁶² El compuesto natural etoxisanguinarina (ESG) (Figura 22) también es capaz de inhibir la proliferación en las células de cáncer de pulmón a través de la regulación negativa de CIP2A.¹⁶³
- Erlotinib es un fármaco perteneciente al grupo de los TKIs específico del EGFR humano tipo-1 expresado en células normales y tumorales. A través de este mecanismo, los EGFR-TKIs impiden la fosforilación intracelular del receptor inhibiendo la proliferación celular y promoviendo la apoptosis de las células tumorales. Este grupo de fármacos son actualmente tratamiento de primera línea, en asociación con quimioterápicos, en el NSCLC avanzado o metastásico con mutaciones activadoras del EGFR.¹⁶⁴ Algunos derivados de erlotinib han demostrado ser capaces de disminuir la expresión transcripcional de CIP2A en ciertos tipos de tumores, aunque el mecanismo por el que lo hacen no está aún aclarado.¹⁶⁵⁻¹⁶⁹

- La niclosamida es un fármaco antihelmíntico que inhibe CIP2A en células de NSCLC, lo cual produce disminución de la proliferación celular y del crecimiento de colonias a través del aumento de actividad de PP2A.¹⁷⁰

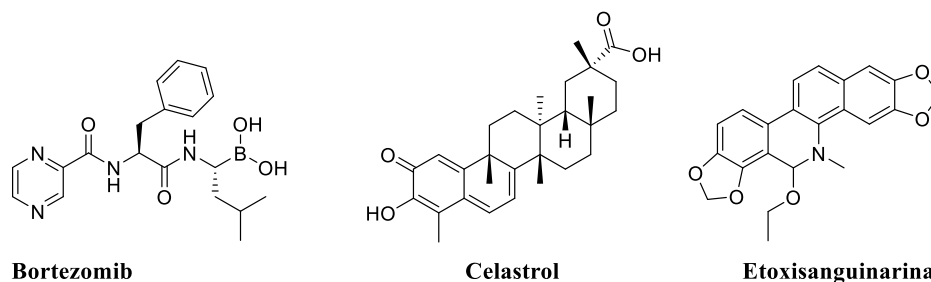


Figura 22. Estructura química de algunos compuestos con actividad sobre CIP2A.

La Figura 23 recoge un esquema de las principales estrategias terapéuticas explicadas.

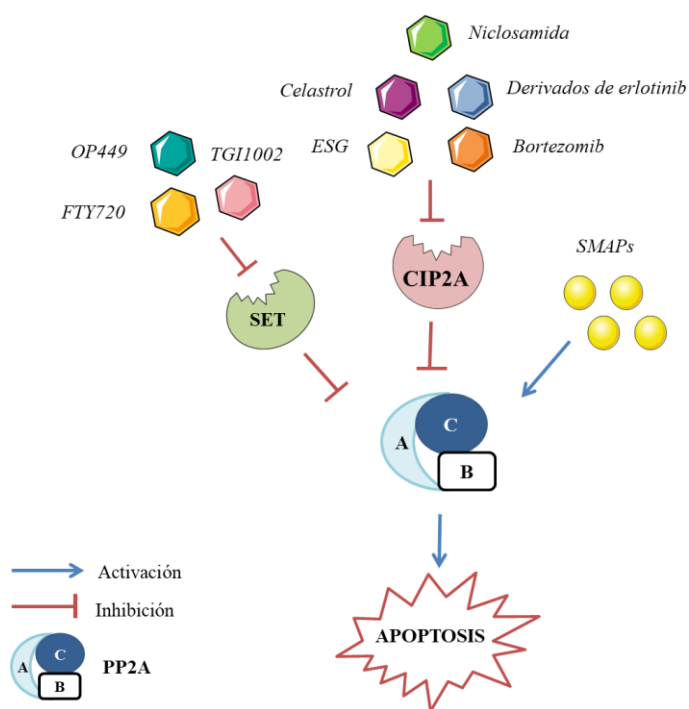


Figura 23. Compuestos que, a través del incremento de la actividad de PP2A por diversos mecanismos, revisten interés en el tratamiento del cáncer.

3. Modulación de enzimas que regulan la actividad de PP2A a nivel postraducciona.

Como se ha mencionado, las modificaciones postraduccionales de PP2A se pueden agrupar en tres categorías: 1) fosforilación en Thr304, 2) fosforilación en Tyr307 y, 3) metilación en Leu309, siendo estas dos últimas las más frecuentes. En este contexto, la forskolina, un principio activo de origen natural, produce activación de PP2A por disminución de su fosforilación en Tyr307 por un mecanismo independiente de activación de la adenilato ciclasa.^{171, 172} Por otro lado, investigando la correlación inversa

entre consumo de café y enfermedades neurodegenerativas, Lee y col. demostraron que el compuesto neuroprotector *N*-eicosanoilserotonina (EHT) (Figura 24), un componente del extracto de café, es capaz de inhibir la desmetilación de Leu309 mediante la formación de un complejo con PP2A que evita su interacción con PME-1, manteniendo así la enzima en su forma activa.^{173, 174} En un modelo *in vivo* de EA inducido por la sobreexpresión de SET, el compuesto EHT mantuvo la actividad fosfatasa de PP2A, revertiendo así la hiperfosforilación de tau, disminuyendo la expresión de β A y el consiguiente déficit cognitivo.¹⁷⁵

En el contexto de la EA, existen otros compuestos capaces de modular la actividad de PP2A por diferentes mecanismos. Este es el caso de la metformina (Figura 24) que, al interferir con MID y α 4 que regulan la degradación de PP2Ac vía proteosoma, previene la hiperfosforilación de tau inducida por AO o fostriecina en cultivos primarios de neuronas murinas.¹⁷⁶

En 2014, Li y col. publicaron que la memantina era capaz de inhibir y revertir la hiperfosforilación y acumulación de tau inducidas por la inhibición de PP2A en cultivo organotípico de rodajas de hipocampo de rata. Sin embargo, estos efectos no se observaban con otros antagonistas del receptor de NMDA.¹⁷⁷ Posteriormente, utilizando células PC12 tratadas con AO, se elucidó que el mecanismo por el que memantina mitigaba la hiperfosforilación de tau era el resultado de un bloqueo del complejo SET/PP2A, posiblemente por evitar la traslocación del inhibidor desde el núcleo al citosol.¹⁷⁸ También el anticolinesterásico donepezilo ha mostrado un efecto activador de PP2A, pero el mecanismo por el que produce tal efecto es desconocido.¹⁷⁹

Koh y col. publicaron que, en modelos *in vivo* de isquemia cerebral en rata e *in vitro* de excitotoxicidad inducida por glutamato donde la expresión de la subunidad B/PR55 de PP2A se encuentra disminuida, la melatonina (Figura 24) ejercía un perfil neuroprotector a través de la inhibición del descenso en la expresión de esta subunidad B.¹⁸⁰

Por otra parte, SEW2871 es un agonista selectivo del receptor 1 de S1P capaz de reducir la fosforilación de la proteína tau (en Ser262) sin afectar al nivel de la proteína tau total y sin modificar la fosforilación de otros residuos, como Ser199/202 y Ser404. SEW2871 también es capaz de disminuir la fosforilación de AMPK (en Thr172) y aumentar la actividad de PP2A por reducción de su fosforilación e incremento de su metilación en rodajas de hipocampo de rata.¹⁸¹

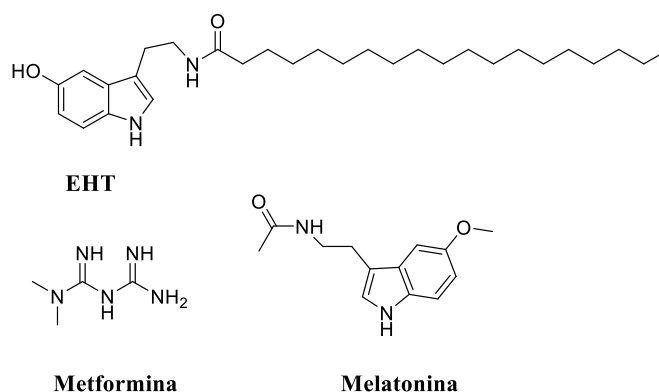


Figura 24. Estructuras de compuestos que activan PP2A por diferentes mecanismos.

SCR-1693 es un híbrido de tacrina-dihidropiridina con efecto dual como inhibidor de acetilcolinesterasa y bloqueante de canales de calcio dependientes de voltaje. Este compuesto es capaz de reducir la fosforilación de PP2A (en Tyr307) por un mecanismo desconocido, lo cual produce disminución de la hiperfosforilación de tau y una reducción de la producción de placas de β A.¹⁸² Además, este híbrido mejoró el déficit cognitivo en un modelo *in vivo* de rata con neuropatología.¹⁸³

En base a todo lo expuesto anteriormente, dentro del contexto de búsqueda de nuevos compuestos que favorezcan la actividad de PP2A y que pudieran tener una utilidad terapéutica en clínica, nuestro grupo de investigación, en colaboración con el grupo del Prof. Marco-Contelles, sintetizó un derivado de tacrina, el ITH12246, el cual mostró un claro perfil neuroprotector. Entre las propiedades farmacológicas del compuesto, se demostró su capacidad para recuperar la actividad fosfatasa de PP2A previamente inhibida por AO.¹⁸⁴ Adicionalmente, a través del mantenimiento de la actividad de PP2A, ITH12246 previno el daño tisular inducido por glutamato en rodajas de hipocampo de rata. Además, en experimentos *in vivo* con ratones, este compuesto fue capaz de paliar la pérdida de memoria ocasionada por escopolamina.¹⁸⁵ En estudios posteriores, nuestro grupo realizó la evaluación farmacológica de una familia de indoles análogos al alcaloide natural gramina, los cuales mostraron una actividad dual al bloquear canales de calcio dependientes de voltaje y ejercer un ligero efecto activador de Ser/Thr fosfatasas. Esta última familia de compuestos, caracterizada por una estructura central de 3-(alquilaminometil)indol, mostró un perfil neuroprotector de amplio espectro, destacando el compuesto ITH12657.¹⁸⁶⁻¹⁸⁸

En la Figura 25 se resumen algunas de las estrategias terapéuticas anteriormente comentadas encaminadas a incrementar la actividad de PP2A para el tratamiento de la EA.

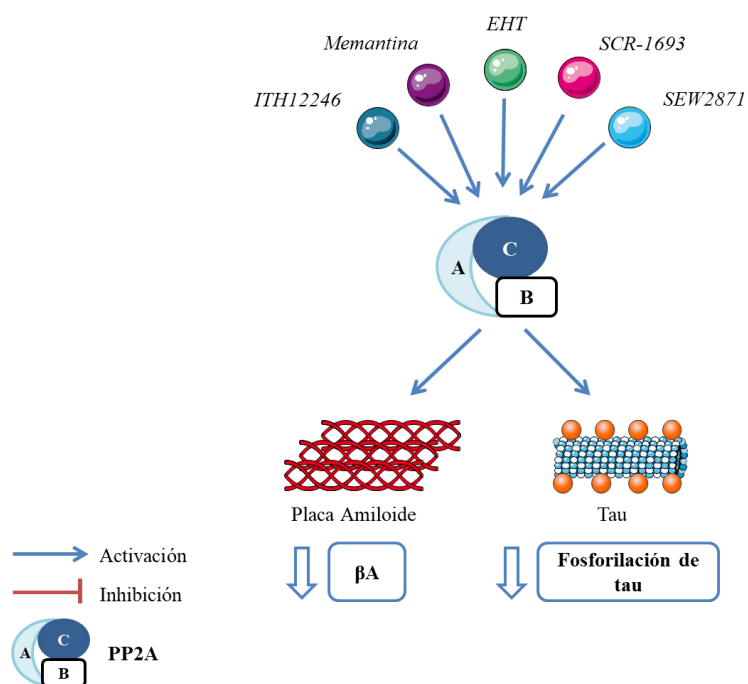


Figura 25. Compuestos dirigidos a PP2A en la EA.

Estos antecedentes resultan alentadores en la búsqueda de nuevos compuestos capaces de modular la actividad fosfatasa de PP2A, la cual se encuentra deprimida tanto en la enfermedad tumoral (NSCLC) como en las enfermedades neurodegenerativas (EA).

HIPÓTESIS DE TRABAJO

Los procesos de fosforilación/desfosforilación constituyen un mecanismo celular clave a la hora de regular el grado de actividad proteica. Los anteriores procesos, llevados a cabo por enzimas cinasas/fosfatasa, están sometidos a un estricto equilibrio, por lo que la pérdida de dicho equilibrio ha sido implicada en diversas y variadas patologías. Entre las enzimas fosfatasa, destaca por su importancia PP2A, cuya actividad está exquisitamente controlada, entre otros mecanismos de regulación, por una serie de inhibidores endógenos. Un exceso de expresión de estos últimos, como ocurre en ciertos tipos de cáncer de pulmón o en la enfermedad de Alzheimer, conduce a una disminución de actividad de dicha fosfatasa.

En esta Tesis nos planteamos como **HIPÓTESIS PRINCIPAL** que compuestos con afinidad por la subunidad catalítica C de PP2A, que no interaccionen en las cercanías del sitio de la hidrólisis de ésteres fosfato, podrían competir con los inhibidores endógenos en su unión a la enzima y, de esta manera, recuperar la correcta actividad fosfatasa de PP2A. Para demostrar esta hipótesis, se propuso el diseño de análogos sintéticos de AO desprovistos de los motivos responsables de la inhibición de la enzima, pero que mantengan la afinidad por esta. Si nuestra hipótesis es correcta, los compuestos sintetizados deberían lograr la recuperación de la actividad fosfatasa de PP2A en modelos celulares *in vitro* de las enfermedades que cursan con una actividad enzimática comprometida.

Cabe destacar que, hasta la fecha, la mayoría de los fármacos dirigidos a regular el desequilibrio en los procesos de fosforilación/desfosforilación celular se enfocan a inhibir la actividad de las cinasas, como es el caso de los inhibidores de tirosina cinasa en cáncer, o los inhibidores de la cinasa GSK-3 β en la enfermedad de Alzheimer. Por este motivo, consideramos que esta hipótesis de trabajo posee un alto carácter innovador y original.

OBJETIVOS

El **OBJETIVO PRINCIPAL** de esta Tesis Doctoral es el desarrollo racional de ligandos capaces de actuar sobre PP2A, compitiendo en la unión al sitio catalítico de la enzima con los inhibidores endógenos de esta. Se pretende, de esta forma, conseguir la reactivación de la actividad fosfatasa de PP2A que está comprometida en ciertos procesos patológicos, como el cáncer de pulmón o la enfermedad de Alzheimer, por un exceso de expresión de los anteriores inhibidores endógenos. Con este fin, se plantean los siguientes **OBJETIVOS PARCIALES**:

1. Búsqueda y diseño de nuevos compuestos activadores de PP2A. En base al estudio de la relación estructura-actividad del AO, se propone el diseño y predicción computacional de la potencial actividad de nuevos ligandos de PP2A análogos al fragmento C19–C27 de AO.
2. Síntesis de análogos de AO. Diseño de la ruta sintética, síntesis orgánica y caracterización estructural de los compuestos.
3. Estudio de las propiedades fisicoquímicas *in silico* de los compuestos sintetizados.
4. Identificación de los compuestos de interés farmacológico en base a su capacidad para recuperar la actividad fosfatasa comprometida de PP2A, utilizando el método de *pNPP* o de verde malaquita.
5. Evaluación farmacológica de un análogo seleccionado del fragmento central de AO en un modelo *in vitro* de quimiorresistencia inducida por nicotina en la línea celular humana de adenocarcinoma de pulmón A549.
6. Evaluación del perfil neuroprotector de los derivados de AO sintetizados en distintos modelos *in vitro* de neurodegeneración relacionados con la enfermedad de Alzheimer.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES Y MÉTODOS DE SÍNTESIS QUÍMICA, CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y ESTUDIO COMPUTACIONAL

1.1. Materiales utilizados

Todos los reactivos empleados para la síntesis química descrita en esta Memoria fueron adquiridos en Sigma-Aldrich/Merck (St. Louis, Missouri; EE.UU.), a excepción del metóxido sódico (MeONa), que se obtuvo de Alfa Aesar (Haverhill, Massachusetts, EE.UU.).

Los disolventes, con calidad analítica, empleados en las reacciones, extracciones y purificaciones, así como los disolventes deuterados utilizados para los ensayos de resonancia magnética nuclear (RMN) y las sales necesarias para la extracción y secado de fases orgánicas, fueron adquiridos en VWR/Avantor (Barcelona, España).

Todas las reacciones descritas se llevaron a cabo bajo las condiciones de Schlenk,¹⁸⁹ es decir, sistema de trabajo semicerrado en el que toda la instrumentación utilizada para la reacción es flameada a vacío y purgada de posibles trazas de humedad y aire, mediante ciclos de vacío/gas inerte (en nuestro caso argón).

La evolución de las reacciones químicas se monitorizó por cromatografía en capa fina (TLC, por sus siglas en inglés *thin layer chromatography*), empleando gel de sílice con tamaño de poro de 60 Å como fase estacionaria (Sigma-Aldrich/Merck, EE.UU.). La fase móvil consistió en distintas mezclas de hexano y acetato de etilo. Dependiendo de la reacción química, la detección de los productos se realizó con luz UV a 254 nm, por revelado con tinción de yodo (Sigma-Aldrich/Merck, EE.UU.) o solución de ácido fosfomolibdico en etanol al 20 % (Acros Organics, Geel, Bélgica).

Varios de los productos sintetizados en esta Memoria requirieron purificación, que se realizó por cromatografía en columna flash automatizada en un equipo Isolera One (Biotage, Madrid, España), con columnas de gel de sílice precargadas SNAP, ZIP o Sfär, del mismo fabricante. El compuesto **6** se purificó por TLC preparativa, que se llevó a cabo empleando como fase estacionaria placas de TLC de gel de sílice de tamaño de poro 60 Å de 20 cm de ancho y como fase móvil mezclas de hexano y acetato de etilo.

1.2. Métodos experimentales de caracterización analítica, estructural y de determinación de la pureza de los compuestos

1.2.1. Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

La obtención de los compuestos deseados se ha confirmado mediante técnicas espectroscópicas, así como su caracterización, comprobando que las señales espectrales corresponden a las estructuras químicas propuestas. Así, todos los compuestos fueron

caracterizados por espectroscopía de RMN de protón (^1H -RMN) y de carbono (^{13}C -RMN), en equipos Bruker Avance 300 (Bruker, España). El disolvente deuterado utilizado se especifica en cada caracterización. Los valores de desplazamientos químicos (δ) se describen en partes por millón (ppm), referenciados internamente mediante la señal traza de ^1H que presenta el disolvente deuterado. Las constantes de acoplamiento (J) se expresan en Hz. Las asignaciones de las señales de RMN de ^1H se realizaron en base a los desplazamientos químicos, la integral relativa de las señales, su multiplicidad y el valor de las constantes de acoplamiento.

Estos experimentos se realizaron por nuestro grupo en el autoservicio de la Unidad de Espectroscopía Molecular, Laboratorio Jesús H. Rodríguez Ramos, Laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear de Líquidos del Servicio Interdepartamental de Investigación (SIIdI), de la Universidad Autónoma de Madrid (UAM). El análisis de los espectros adquiridos se realizó mediante el programa MestReNova 10.0 (Mestrelab Research; Santiago, España).

1.2.2. Espectrometría de Masas Molecular

Los espectros de masas de alta resolución (EMAR) se obtuvieron por la técnica de Electrospray en modo positivo, con un espectrómetro VG AutoSpec Waters/QSTAR (Applied Biosystems, EE.UU.). Estos análisis se realizaron en la Unidad de Espectrometría de Masas, Laboratorio de Espectrometría de Masas del SIIdI de la UAM. Los datos obtenidos se expresan en unidades de relación masa/carga (m/z).

1.2.3. Puntos de fusión (Pf)

Los puntos de fusión de los compuestos descritos en esta Memoria se obtuvieron en el aparato Melting Point modelo SMP10 Stuart (Reino Unido) y están sin corregir.

1.2.4. Rotación óptica

Los compuestos de esta Memoria presentan centros quirales y se han obtenido por procedimientos enantioselectivos, diastereoselectivos o que no provocan racemización. Por ello, su exceso enantiomérico y pureza óptica se han caracterizado mediante desviación óptica rotatoria. Las rotaciones específicas de los compuestos se analizaron en un polarímetro Perkin Elmer 241 (Waltham, Massachusetts, EE. UU.) con una lámpara de Na (celda de vidrio de 20×100 mm). Las desviaciones ópticas rotatorias se obtienen mediante la fórmula $[\alpha]_D = \alpha / l \times c$; donde α es la rotación específica observada en el aparato, l es la longitud de la celda en dm, c es la concentración en g/mL y D es la longitud de onda (nm) que corresponde a 589 nm (línea D del Na).

1.2.5. Análisis químico elemental

Todos los compuestos sintetizados descritos y evaluados farmacológicamente en esta Memoria presentan pureza analítica, determinada por análisis químico elemental utilizando un analizador LECO CHNS-932 (LECO, España). La diferencia entre los valores experimentales y calculados de C, H y N para cada fórmula empírica es menor del 0,5 %. Estos análisis se llevaron a cabo en la Unidad de Análisis Químico Elemental del SIdI de la UAM.

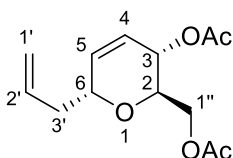
1.2.6. Difracción de rayos X

La obtención de la estructura cristalográfica del compuesto estudiado se llevó a cabo mediante difracción de rayos X. El monocristal del compuesto se consiguió mediante evaporación lenta del disolvente en una mezcla 1:1 diclorometano:metanol a temperatura ambiente (t.a.). Los datos de difracción de rayos X se recogieron en un difractómetro Bruker Kappa Apex II (Bruker, España). Estos análisis se realizaron en la Unidad de Rayos X de Monocristal, Laboratorio de Difracción de Rayos X del SIdI de la UAM.

1.3. Síntesis química

Para la obtención de los compuestos objeto de esta Memoria, análogos del fragmento C19–C27 del ácido okadaico, se siguió inicialmente el procedimiento de síntesis en cadena descrito por Ichikawa y col.,¹⁹⁰ a partir del cual se han realizado modificaciones y alternativas sintéticas para cada paso de reacción, con el fin de optimizar la obtención de compuestos propuestos en cuanto a rendimiento, pureza y escalado.

1.3.1. Síntesis de acetato de [(2*R*,3*S*,6*R*)-3-acetoxi-6-alil-3,6-dihidro-2*H*-piran-2-il]metilo (**1**)



Según lo descrito por Ichikawa y col.¹⁹⁰ con ligeras modificaciones, el sustrato comercial triacetato de D-glucal (5 g, 18,36 mmol) se disolvió en CH₂Cl₂ (1 mL/mmol, 18 mL) recién destilado sobre CaH₂. La disolución se enfrió a –50 °C y se añadió trifluoruro de boro etileterato (BF₃–Et₂O) (1 eq, 2,32 mL, 18,36 mmol) y aliltrimetilsilano (1 eq, 2,92 mL, 18,36 mmol) gota a gota, manteniéndose la reacción 1,5 h en agitación a dicha temperatura. Posteriormente, se dejó que la reacción alcanzara t.a. y se añadió una disolución saturada de NaHCO₃ hasta alcanzar pH neutro. La mezcla se extrajo con CH₂Cl₂ (3 × 20 mL). La fase orgánica combinada se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y el disolvente se evaporó a vacío, obteniéndose **1** como un aceite incoloro (4,66 g, >99 %) con características espectrales y analíticas similares a lo descrito en la literatura,¹⁹⁰ por

lo que no se necesitó purificación cromatográfica. $[\alpha]^{25}_D +78,9$ (c 1,44; CH_2Cl_2) (lit. $+64,0$; c 1,00; CHCl_3).¹⁹¹

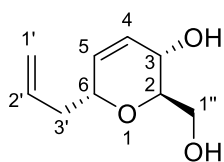
RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ 5,66 (dd, $J = 1,2, 10,5$ Hz, 1H, H4), 5,57 (m, 1H, H2'), 5,50 (dd, $J = 2,1, 10,5$ Hz, 1H, H5), 4,88–4,75 (m, 3H, H3, H1'), 4,03–3,77 (m, 3H, H6, H1''), 3,65 (m, 1H, H2), 2,22–1,94 (2m, 2H, H3'), 1,78 (s, 3H, CH_3), 1,75 (s, 3H, CH_3).

RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75,4 MHz) δ 169,5, 169,3, 133,7, 132,2, 123,2, 116,6, 70,5, 69,1, 64,3, 62,1, 37,1, 20,1, 19,9.

Anal. Elem. calc. para $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{O}_5 \cdot 1/2 \text{H}_2\text{O}$: C, 59,30; H, 7,27. Encontrado: C, 59,43; H, 6,78.

EMAR (API-ES+) m/z calc. para $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{O}_5\text{Na}$ 277,1052 ($\text{M}+\text{Na}^+$). Encontrado: 277,1058.

1.3.2. Síntesis de (2R,3S,6R)-6-alil-3,6-dihidro-2-(hidroximetil)-3,6-dihidro-2H-piran-3-ol (2)



Seguendo el procedimiento descrito por Fuwa y col.,¹⁹² a una disolución del compuesto **1** (2,50 g, 9,83 mmol) en metanol (MeOH ; 3,25 mL/ mmol), se adicionó MeONa (2 eq, 1,06 g, 19,66 mmol). La reacción se mantuvo en agitación a t.a. durante 16 h. Cuando se confirmó la desaparición del producto de partida, se eliminó el MeOH por evaporación y se añadió una solución saturada de NH_4Cl hasta que la mezcla tuvo un pH 7. La extracción del producto se realizó mediante lavados sucesivos con CH_2Cl_2 (3×50 mL). La fase orgánica combinada se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se evaporó, obteniéndose **2** como un aceite amarillo (1,67 g, >99 %) con características espectrales y analíticas análogas a lo descrito en la literatura¹⁹³ y, por tanto, sin necesidad de purificación. $[\alpha]^{25}_D -15,5$ (c 1,22; CH_2Cl_2) (lit. $-23,8$, c 0,88; CHCl_3).¹⁹³

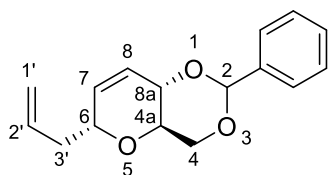
RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ 5,85–5,64 (m, 3H, H4, H2', H5), 5,12–4,99 (m, 2H, H1'), 4,17 (m, 1H, H6), 4,04 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H, H3), 3,82 (bs, 2H, OH), 3,72 (d, $J = 3,6$ Hz, 2H, H1''), 3,45 (m, 1H, H2), 2,47–2,17 (2m, 2H, H3').

RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75,4 MHz) δ 134,4, 130,0, 129,0, 117,4, 73,3, 72,2, 63,1, 62,1, 37,8.

Anal. Elem. calc. para $\text{C}_9\text{H}_{14}\text{O}_3 \cdot 1/4 \text{H}_2\text{O}$: C, 61,87; H, 8,37. Encontrado: C, 61,73; H, 7,97.

EMAR (API-ES+) m/z calc. para $\text{C}_9\text{H}_{14}\text{O}_3\text{Na}$ 193,0841 ($\text{M}+\text{Na}^+$). Encontrado: 193,0831.

1.3.3. Síntesis de (4aR,6R,8aS)-6-alil-2-fenil-4,4a,6,8a-tetrahidropirano[3,2-d][1,3]dioxina (3)



Basado en el método descrito por Ichikawa y col.,¹⁹⁰ con modificaciones. A una disolución del diol **2** (345 mg, 2,03 mmol) en 1,2-dicloroetano (1,6 mL/mmol, 3,25 mL) bajo argón, se añadió ácido canforsulfónico (CSA) (2 eq, 943 mg, 4,06 mmol) y dimetoximetilbenceno (1 eq, 305 μL , 2,03 mmol). La reacción se mantuvo en agitación a t.a. 16

h, después de lo cual se interrumpió por adición de una solución saturada de NaHCO_3 (20 mL). La reacción se extrajo con CH_2Cl_2 (3×20 mL), y la fase orgánica combinada se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se evaporó. El crudo de reacción se purificó mediante cromatografía flash empleando hexano/acetato de etilo (90/10) como mezcla eluyente, obteniéndose **3** como un sólido blanco (310 mg, 59 %), con características espectrales y analíticas análogas a las descritas en la literatura.¹⁹⁰ P.f. 60–62 °C (lit. 63 °C),¹⁹⁰ $[\alpha]^{25}_{\text{D}} +36,0$ (c 1,11; CH_2Cl_2) (lit. +26,7, c 1,25; CHCl_3).¹⁹⁰

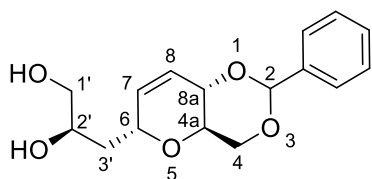
RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ 7,58–7,47 (m, 2H, Ar), 7,46–7,33 (m, 3H, Ar), 6,03 (d, $J = 7,0$ Hz, 1H, H8), 5,97–5,80 (m, 1H, H2'), 5,77 (dt, $J = 7,0, 3,0$ Hz, 1H, H7), 5,60 (s, 1H, H2), 5,22–5,08 (m, 2H, H1'), 4,42–4,26 (m, 2H, H6, H8a), 4,16 (dm, 1H, H4), 3,78 (t, $J = 10,2$ Hz, 1H, H4), 3,69–3,58 (m, 1H, H4a), 2,59–2,44 (m, 1H, H3'), 2,43–2,29 (m, 1H, H3').

RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75,4 MHz) δ 137,6, 134,4, 130,3, 129,2, 128,5, 127,0, 126,4, 117,8, 102,1, 75,4, 74,0, 69,9, 65,6, 38,4.

Anal. Elem. calc. para $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_3 \cdot 1/2 \text{H}_2\text{O}$: C, 71,89; H, 7,16. Encontrado: C, 71,27; H, 7,25.

EMAR (API-ES+) m/z calc. para $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_3\text{Na}$ 281,1154 ($\text{M}+\text{Na}^+$). Encontrado: 281,1161.

1.3.4. Síntesis de (2R)-3-[(4aR,6R,8aS)-2-fenil-4,4a,6,8a-tetrahidropirano[3,2-d][1,3]dioxin-6-il]propan-1,2-diol (**4**)



Según el protocolo descrito por Mohapatra y col..¹⁹⁴ A una solución de **3** (120 mg, 0,46 mmol) en una mezcla de *t*-BuOH y H_2O (1:1, v/v, 9,4 mL) a 0 °C, se adicionó el reactivo AD-mix- α (1,8 eq, 645 mg, 0,83 mmol). La reacción se mantuvo en

agitación a esa temperatura durante 6 h. Una vez completada la reacción (TLC), se neutralizó con solución acuosa saturada de NaHSO_3 (10 mL). De la mezcla de reacción se eliminó el *t*-BuOH por evaporación y la fase acuosa resultante se extrajo con acetato de etilo (3×10 mL). La fase orgánica combinada se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y evaporó el disolvente, obteniéndose **4** como un sólido blanco (112 mg, 82 %). P.f. 121 °C, $[\alpha]^{25}_{\text{D}} +50,4$ (c 1,11; CH_2Cl_2).

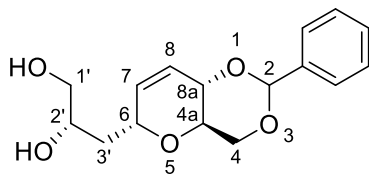
RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ 7,52–7,46 (m, 2H, Ar), 7,40–7,34 (m, 3H, Ar), 6,00 (dm, $J = 10,2$ Hz, 1H, H8), 5,69 (dm, $J = 10,2$ Hz, 1H, H7), 5,58 (s, 1H, H2), 4,53 (m, 1H, H6), 4,26 (dd, $J = 10,2, 4,5$ Hz, 1H, H8a), 4,15 (bd, $J = 8,1$ Hz, 1H, H4), 3,94 (m, 1H, H2'), 3,77 (t, $J = 10,2$ Hz, 1H, H4), 3,67–3,57 (m, 2H, H1'), 3,56–3,45 (m, 1H, H4a), 2,90 (bs, 2H, OH), 2,00–1,84 (m, 1H, H3'), 1,70–1,57 (dm, $J = 14,3$ Hz, 1H, H3').

RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75,4 MHz) δ 137,4, 130,1, 129,3, 128,5, 127,1, 126,3, 102,1, 75,0, 74,0, 71,6, 69,5, 66,3, 65,4, 35,7.

Anal. Elem. calc. para $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{O}_5 \cdot 1/3 \text{H}_2\text{O}$: C, 63,14; H, 7,07. Encontrado: C, 62,77; H, 6,75.

EMAR (API-ES+) m/z calc. para $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{O}_5\text{Na}$ 315,1202 ($\text{M}+\text{Na}^+$). Encontrado: 315,1204.

1.3.5. Síntesis de (2S)-3-[(4aR,6R,8aS)-2-fenil-4,4a,6,8a-tetrahidropirano[3,2-d][1,3]dioxin-6-il]propano-1,2-diol (5)



Similar al procedimiento anterior 1.3.4, pero con el empleo de AD-mix- β . A una disolución de **3** (89 mg, 0,34 mmol) en una mezcla de *t*-BuOH y H₂O (1:1, v/v, 6,8 mL) a 0 °C, se adicionó el reactivo AD-mix- β (1,8 eq, 477 mg, 0,61 mmol). La

reacción se mantuvo en agitación a esa temperatura durante 6 h. Una vez completada la reacción (TLC), se neutralizó con solución acuosa saturada de NaHSO₃ (10 mL). De la mezcla de reacción se eliminó el *t*-BuOH por evaporación y la fase acuosa resultante se extrajo con acetato de etilo (3 \times 10 mL). La fase orgánica combinada se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y evaporó, obteniéndose **5** como un sólido blanco (101 mg, >99 %). P.f. 130 °C, $[\alpha]^{25}_D$ +38,4 (*c* 1,20; CH₂Cl₂).

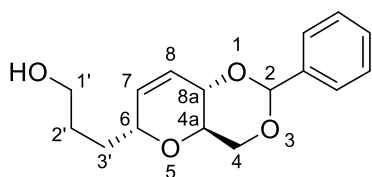
RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ 7,49 (m, 2H, Ar), 7,36 (m, 3H, Ar), 6,01 (m, 1H, H8), 5,70 (dm, *J* = 10,2 Hz, 1H, H7), 5,59 (s, 1H, H2), 4,59 (dm, *J* = 8,7 Hz, 1H, H6), 4,26 (dd, *J* = 10,5, 4,5 Hz, 1H, H8a), 4,15 (m, 1H, H4), 3,96 (m, 1H, H2'), 3,78 (t, *J* = 10,2 Hz, 1H, H4), 3,66 (dm, *J* = 11,1 Hz, 1H, H1'), 3,56 (m, 1H, H1'), 3,48 (dd, 1H, H4a), 2,64 (bs, 2H, OH), 1,81 (ddd, *J* = 14,7, 11,1, 3,3 Hz, 1H, H3'), 1,60–1,47 (m, 1H, H3').

RMN de ¹³C (CDCl₃, 75,4 MHz) δ 137,5, 130,9, 129,3, 128,5, 126,8, 126,3, 102,1, 75,4, 71,1, 69,8, 69,2, 67,0, 65,3, 36,0.

Anal. Elem. calc. para C₁₆H₂₀O₅: C, 65,74; H, 6,98. Encontrado: C, 65,42; H, 7,05.

EMAR (API-ES+) *m/z* calc. para C₁₆H₂₀O₅Na 315,1203 (M+Na⁺). Encontrado: 315,1198.

1.3.6. Síntesis de 3-[(4aR,8aS)-2-fenil-4,4a,6,8a-tetrahidropirano[3,2-d][1,3]dioxin-6-il]propan-1-ol (6)



Siguiendo el protocolo descrito por Clausen y Floreancig,¹⁹⁵ con modificaciones, a una disolución de **3** (421 mg, 1,63 mmol) en tetrahidrofurano (THF) recién destilado (1,35 mL/mmol, 2,20 mL), se añadió 9-borabicyclo[3,3,1]nonano (9-BBN, 0,5 M

en THF, 1 eq, 3,26 mL, 1,63 mmol) lentamente, y se mantuvo en agitación a t.a. durante 1 h. A continuación, la reacción se enfrió a 0 °C y se añadió sucesivamente NaOH 3M (1 mL/mmol, 1,6 mL) y H₂O₂ 30 % (1 mL/mmol, 1,6 mL), permitiendo que la reacción alcanzara t.a., después de lo cual se mantuvo en agitación durante 30 min. La mezcla de reacción se extrajo con CH₂Cl₂ neutralizado (3 \times 10 mL), se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y evaporó. El crudo de reacción se purificó por TLC preparativa usando una mezcla hexano/acetato de etilo (25/75) como eluyente, obteniéndose **6** como un sólido blanco (99 mg, 22 %) y con características espectrales

y analíticas análogas a las descritas en la literatura.¹⁹⁰ P.f. 82 °C (lit. 81 °C),¹⁹⁰ $[\alpha]^{25}_D +15,1$ (*c* 1,00; CH₂Cl₂) (lit. +31,0, *c* 1,05; CHCl₃).¹⁹⁰

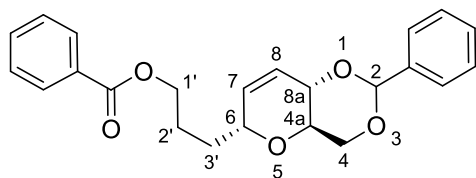
RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ 7,54–7,48 (m, 2H, Ar), 7,42–7,33 (m, 3H, Ar), 5,97 (d, *J* = 10,5 Hz, 1H, H8), 5,73 (dt, *J* = 10,5, 2,6 Hz, 1H, H7), 5,60 (s, 1H, H2), 4,33–4,25 (m, 2H, H8a, H6), 4,15 (dm, 1H, H4), 3,78 (t, *J* = 10,3 Hz, 1H, H4), 3,70 (m, 2H, H1'), 3,60 (m, 1H, H4a), 1,87–1,62 (m, 4H, H2', H3').

RMN de ¹³C (CDCl₃, 75,4 MHz) δ 137,6, 130,9, 129,9, 129,2, 128,5, 126,7, 126,4, 102,1, 75,5, 74,6, 69,9, 65,3, 62,8, 30,2, 29,9.

Anal. Elem. calc. para C₁₆H₂₀O₄·1/4 H₂O C, 68,43; H, 7,36. Encontrado: C, 68,66; H, 7,88.

EMAR (API-ES+) *m/z* calc. para C₁₆H₂₀O₄Na 299,1259 (M+Na⁺). Encontrado: 299,1267.

1.3.7. Síntesis de benzoato de 3-[(4aR,6R,8aS)-2-fenil-4,4a,6,8a-tetrahidropirano[3,2-d][1,3]dioxin-6-il]propilo (7)



Seguendo el protocolo descrito por Ichikawa y col.,¹⁹⁰ con ligeras modificaciones. A una disolución de **6** (94 mg, 0,34 mmol) en piridina (3 mL/mmol, 1 mL), se añadió cloruro de benzoilo (BzCl) (1,1 eq,

0,37 mmol, 43 μL) gota a gota a t.a. y la reacción se mantuvo en agitación 18 h. Posteriormente, la reacción se interrumpió por dilución con CHCl₃ neutralizado (10 mL) y se lavó con H₂O (10 mL) y NH₄Cl (2 × 10 mL). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y evaporó. El crudo de reacción se purificó mediante cromatografía flash automatizada empleando una mezcla hexano/acetato de etilo (85/15) como eluyente, obteniéndose **7** como un sólido blanco (19 mg, 15 %) y con características espectrales y analíticas análogas a lo descrito en la literatura.¹⁹⁰ P.f. 86–88 °C (lit. 84 °C),¹⁹⁰ $[\alpha]^{25}_D +10,0$ (*c* 0,99; CH₂Cl₂) (lit. +11,7, *c* 1,58; CHCl₃).¹⁹⁰

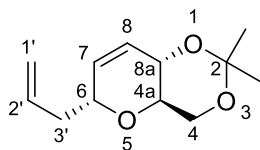
RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ 8,05 (m, 2H, Ar), 7,60–7,44 (m, 5H, Ar), 7,39–7,33 (m, 3H, Ar), 6,00 (bd, *J* = 10,5 Hz, 1H, H8), 5,74 (dm, *J* = 10,5 Hz, 1H, H7), 5,60 (s, 1H, H2), 4,39 (m, 2H, H1'), 4,30 (dd, *J* = 9,9, 4,5 Hz, 2H, H6, H8a), 4,15 (dm, *J* = 8,1 Hz, 1H, H4), 3,78 (t, *J* = 10,2 Hz, 1H, H4), 3,60 (ddd, *J* = 9,6, 8,1, 4,5 Hz, 1H, H4a), 2,09–1,81 (m, 3H, H2', H3'), 1,75–1,63 (m, 1H, H3').

RMN de ¹³C (CDCl₃, 75,4 MHz) δ 137,6, 133,1, 130,6, 130,4, 129,7, 129,2, 128,6, 128,5, 126,9, 126,4, 102,1, 75,5, 74,1, 69,9, 65,4, 64,7, 30,0, 25,9.

Anal. Elem. calc. para C₂₃H₂₄O₅·1/3 H₂O: C, 71,49; H, 6,43. Encontrado: C, 71,68; H, 6,39.

EMAR (API-ES+) *m/z* calc. para C₂₃H₂₄O₅Na 403,1516 (M+Na⁺). Encontrado: 403,1516.

1.3.8. Síntesis de (4aR,6R,8aS)-6-alil-2,2-dimetil-4,4a,6,8a-tetrahidropirano[3,2-d][1,3]dioxina (8)



Siguiendo el protocolo descrito por Nicolau y col.¹⁹⁶ A una solución del diol **2** (1,24 g, 7,29 mmol) en CH₂Cl₂ (4 mL/mmol, 30 mL) a 0 °C se añadió *p*-toluensulfonato de piridinio (PPTS) (0,05 eq, 90 mg, 0,36 mmol) y 2-metoxipropeno (1,5 eq, 10,93 mmol, 1,05 mL) gota a gota durante 15 min. La mezcla de reacción se agitó a 0 °C durante 2 h. Posteriormente, se permitió alcanzar t.a. a la mezcla de reacción para añadir 1 eq más de 2-metoxipropeno (700 µL, 7,29 mmol), y agitar a t.a. durante 3 h más. La reacción se siguió por TLC y, una vez completada, se diluyó con éter etílico (Et₂O). La mezcla de reacción se lavó con H₂O (2 × 20 mL) y salmuera (1 × 20 mL), se secó de trazas de agua con MgSO₄ anhidro, se filtró y el disolvente se evaporó a vacío, obteniendo **8** como un aceite amarillento (1,53 g, >99 %) con características espectrales y analíticas análogas a lo descrito en la literatura.¹⁹⁶ [α]_D²⁵ -25,6 (*c* 1,06; CH₂Cl₂) (lit. -19,9; *c* 2,02; CHCl₃).¹⁹⁶

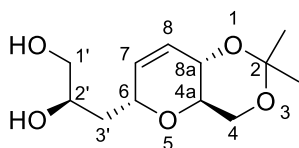
RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ 5,80–5,65 (m, 2H, H7, H8), 5,63 (dt, *J* = 10,5, 2,4 Hz, 1H, H2'), 5,05–4,95 (m, 2H, H1'), 4,15 (m, 1H, H6), 4,06 (dm, *J* = 8,4 Hz, 1H, H8a), 3,75 (dd, *J* = 10,5, 5,0 Hz, 1H, H4), 3,62 (t, *J* = 10,5 Hz, 1H, H4), 3,30 (ddd, *J* = 10,5, 8,5, 5,0 Hz, 1H, H4a), 2,42–2,28 (m, 1H, H3'), 2,26–2,13 (m, 1H, H3'), 1,41 (s, 3H, CH₃), 1,32 (s, 3H, CH₃).

RMN de ¹³C (CDCl₃, 75,4 MHz) δ 134,5, 130,0, 127,7, 117,6, 99,8, 73,9, 67,8, 66,7, 63,5, 38,5, 29,4, 19,2.

Anal. Elem. calc. para C₁₂H₁₈O₃: C, 68,54; H, 8,63. Encontrado: C, 68,73; H, 8,55.

EMAR (API-ES+) *m/z* calc. para C₁₂H₁₈O₃Na 433,2404 (2M+Na⁺). Encontrado: 443,2404.

1.3.9. Síntesis de (2R)-3-[(4aR,6R,8aS)-2,2-dimetil-4,4a,6,8a-tetrahidropirano[3,2-d][1,3]dioxin-6-il]propano-1,2-diol (9)



Siguiendo el protocolo descrito por Mohapatra y col.¹⁹⁴ a una solución de **8** (95 mg, 0,45 mmol) en una mezcla *t*-BuOH y H₂O (1:1, v/v, 6,3 mL) a 0 °C, se añadió el reactivo AD-mix- α (1,8 eq, 631 mg, 0,81 mmol), manteniéndose en agitación a esa temperatura durante 6 h. Una vez completada la reacción (TLC), se neutralizó con solución acuosa saturada de NaHSO₃ (10 mL). De la mezcla de reacción se eliminó el *t*-BuOH por evaporación y la fase acuosa resultante se extrajo con acetato de etilo (3 × 10 mL). La fase orgánica combinada se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y evaporó el disolvente, obteniéndose **9** como un aceite amarillento (73 mg, 63 %). [α]_D²⁵ +16,5 (*c* 1,01; CH₂Cl₂).

RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ 5,83 (m, 1H, H8), 5,63 (dt, *J* = 10,5, 2,4 Hz, 1H, H7), 4,49 (dm, *J* = 10,5 Hz, 1H, H6), 4,18 (bd, *J* = 8,1 Hz, 1H, H8a), 3,92 (m, 1H, H2'), 3,84 (dd, *J* = 10,5, 5,1 Hz, 1H, H4), 3,74 (t, *J* = 10,5 Hz, 1H, H4), 3,61 (ddd, *J* = 11,1, 3,6, 0,6 Hz, 1H, H1'), 3,55–3,38

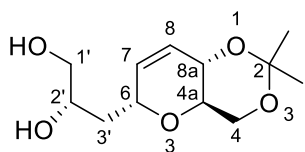
(m, 2H, H1', H4a), 3,10 (bs, 2H, OH), 1,98–1,83 (m, 1H, H3'), 1,59 (dt, $J = 14,7, 3,3$ Hz, 1H, H3'), 1,50 (s, 3H, CH₃), 1,42 (s, 3H, CH₃).

RMN de ¹³C (CDCl₃, 75,4 MHz) δ 129,8, 127,9, 100,0, 74,2, 71,7, 67,4, 66,5, 66,4, 63,2, 35,8, 29,3, 19,1.

Anal. Elem. calc. para C₁₂H₂₀O₅·1/8 H₂O: C, 59,00; H, 8,25. Encontrado C, 58,41; H, 8,28.

EMAR (API-ES+) m/z calc. para C₁₂H₂₀O₅Na 267,1203 (M+Na⁺). Encontrado: 267,1201.

1.3.10. Síntesis de (2S)-3-[(4aR,6R,8aS)-2,2-dimetil-4,4a,6,8a-tetrahidropirano[3,2-d][1,3]dioxin-6-il]propano-1,2-diol (10)



Siguiendo el protocolo descrito por Mohapatra y col.,¹⁹⁴ con modificaciones. A una disolución de **8** (80 mg, 0,38 mmol) en una mezcla de *t*-BuOH y H₂O (1:1, v/v, 6,3 mL) a 0 °C, se añadió el reactivo AD-mix- β (1,8 eq, 534 mg, 0,68 mmol) manteniéndose en agitación a esa temperatura durante 6 h. Una vez completada la reacción (TLC), se neutralizó mediante la adición de solución acuosa saturada de NaHSO₃ (10 mL). De la mezcla de reacción se eliminó el *t*-BuOH por evaporación y la fase acuosa resultante se extrajo con acetato de etilo (3 \times 10 mL). La fase orgánica combinada se secó con Na₂SO₄ anhidro, obteniéndose **10** como un aceite amarillento (80 mg, 82 %). $[\alpha]_D^{25} -13,7$ (c 1,10; CH₂Cl₂).

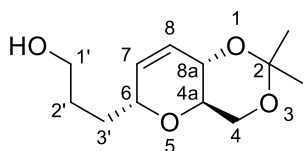
RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ 5,81 (m, 1H, H8), 5,63 (dm, $J = 10,5$ Hz, 1H, H7), 4,50 (dm, $J = 11,0$ Hz, 1H, H6), 4,17 (dm, $J = 7,8$ Hz, 1H, H8a), 3,94–3,78 (m, 2H, H2', H4), 3,72 (t, $J = 9,0$ Hz, 1H, H4), 3,59 (dd, $J = 11,2, 3,2$ Hz, 1H, H1'), 3,46–3,27 (m, 2H, H1', H4a), 3,25 (bs, 2H, OH), 1,79–1,63 (m, 1H, H3'), 1,49 (s, 3H, CH₃), 1,46 (m, 1H, H3'), 1,40 (s, 3H, CH₃).

RMN de ¹³C (CDCl₃, 75,4 MHz) δ 130,7, 127,4, 99,9, 70,9, 69,1, 67,7, 67,0, 66,3, 63,3, 36,1, 29,3, 19,1.

Anal. Elem. calc. para C₁₂H₂₀O₅: C, 59,00; H, 8,25. Encontrado: C, 58,86; H, 8,10.

EMAR (API-ES+) m/z calc. para C₁₂H₂₀O₅Na 267,1203 (M+Na⁺). Encontrado: 267,1203.

1.3.11. Síntesis de 3-[(4aR,6R,8aS)-2,2-dimetil-4,4a,6,8a-tetrahidropirano[3,2-d][1,3]dioxin-6-il]propan-1-ol (11)



De acuerdo al método descrito por Clausen y Floreancig,¹⁹⁵ a una disolución de **8** (1,24 g, 5,88 mmol) en THF recién destilado (1,35 mL/mmol, 7,9 mL) se añadió 9-BBN 0,5 M en THF (1 eq, 8,1 mL, 4,06 mmol) lentamente bajo argón, y se mantuvo en agitación a t.a. durante 1 h. A continuación, la reacción se enfrió a 0 °C y se añadió sucesivamente NaOH 3M (1 mL/mmol, 5,9 mL) y H₂O₂ 30 % (1mL/mmol, 5,9 mL), permitiendo que la reacción alcanzara t.a., después de lo cual se mantuvo en agitación durante 30 min. La mezcla de reacción se extrajo con CH₂Cl₂ neutralizado (3 \times 30 mL), se secó Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se evaporó. El crudo de reacción se purificó

mediante cromatografía flash robotizada con una mezcla hexano/acetato de etilo (60/40) como eluyente, obteniéndose **11** como un aceite incoloro (1,10 g, 82 %) con características espectrales y analíticas análogas a las descritas en la literatura.¹⁹⁶ $[\alpha]^{25}_D -14,7$ (*c* 1,16; CH₂Cl₂) (lit. $-18,0$, *c* 1,20; CHCl₃).¹⁹⁶

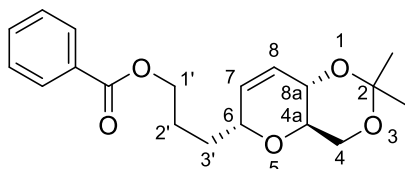
RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ 5,83 (dm, *J* = 10,5 Hz, 1H, H8), 5,68 (dt, *J* = 10,5, 2,4 Hz, 1H, H7), 4,21 (m, 2H, H6, H8a), 3,88 (dd, *J* = 10,8, 5,1 Hz, 1H, H4), 3,75 (t, *J* = 10,5 Hz, 1H, H4), 3,67 (m, 2H, H1'), 3,40 (ddd, *J* = 10,2, 8,1, 4,8 Hz, 1H, H4a), 1,80–1,56 (m, 5H, H2', H3', OH), 1,52 (s, 3H, CH₃), 1,43 (s, 3H, CH₃).

RMN de ¹³C (CDCl₃, 75,4 MHz) δ 130,6, 127,4, 99,9, 74,5, 67,8, 66,4, 63,5, 62,8, 30,3, 29,9, 29,4, 19,2.

Anal. Elem. calc. para C₁₂H₂₀O₄: C, 63,14; H, 8,83. Encontrado: C, 63,35; H, 8,79.

EMAR (API-ES+) *m/z* calc. para C₁₂H₂₀O₄Na 267,1203 (M+Na⁺). Encontrado: 267,1203.

1.3.12. Síntesis de benzoato de 3-[(4aR,6R,8aS)-2,2-dimetil-4,4a,6,8a-tetrahidropirano[3,2-d][1,3]dioxin-6-il]propilo (**12**)



Siguiendo el protocolo descrito por Ma y col.,¹⁹⁷ con ligeras modificaciones. A una disolución de **11** (60 mg, 0,26 mmol) en piridina (3 mL/mmol, 780 μ L), se añadió BzCl (1,1 eq, 0,28 mmol, 33 μ L) gota a gota a t.a. y la reacción se mantuvo

en agitación 18 h. Posteriormente, la reacción se interrumpió por dilución con CHCl₃ (10 mL) y se lavó con H₂O (10 mL) y NH₄Cl (2 \times 10 mL). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y evaporó. El crudo de reacción se purificó mediante cromatografía flash automatizada empleando una mezcla de hexano/acetato de etilo (85/15) como eluyente, obteniéndose **12** como un sólido blanco (7 mg, 8 %). P.f. 82 °C, $[\alpha]^{25}_D -21,0$ (*c* 1,00; CH₂Cl₂).

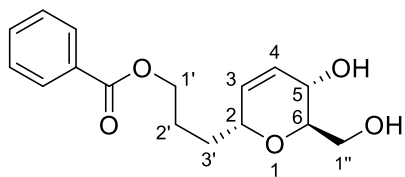
RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 8,04 (d, *J* = 7,8 Hz, 2H, Ar), 7,56 (m, 1H, Ar), 7,44 (m, 2H, Ar), 5,85 (bd, *J* = 10,5 Hz, 1H, H8), 5,70 (dt, *J* = 10,5, 2,4 Hz, 1H, H7), 4,36 (m, 2H, H1'), 4,26 (m, 1H, H6), 4,20 (d, *J* = 8,7 Hz, 1H, H8a), 3,89 (dd, *J* = 10,5, 5,1 Hz, 1H, H4), 3,76 (t, *J* = 10,5 Hz, 1H, H4), 3,41 (ddd, *J* = 10,2, 8,7, 5,1 Hz, 1H, H4a), 2,04–1,76 (m, 3H, H2', H3'), 1,71–1,50 (m, 1H, H3'), 1,53 (s, 1H, CH₃), 1,44 (s, 1H, CH₃).

RMN de ¹³C (CDCl₃, 75,4 MHz) δ 166,8, 133,1, 131,0, 130,4, 129,7, 128,5, 100,1, 73,3, 72,2, 64,8, 64,3, 63,1, 31,1, 29,6, 25,8.

Anal. Elem. calc. para C₁₉H₂₄O₅·1/3 H₂O: C, 67,44; H, 7,35. Encontrado: C, 67,46; H, 6,97.

EMAR (API-ES+) *m/z* calc. para C₁₉H₂₄O₅ 355,1516 (M+Na⁺). Encontrado: 355,1520.

1.3.13. Síntesis de benzoato de 3-[(2R,5S,6R)-5,6-dihidro-5-hidroxi-6-(hidroximetil)-2H-piran-2-il]propilo (**13**)



A una disolución de **11** (109 mg, 0,48 mmol) en CH₂Cl₂ (2 mL) se añadió K₂CO₃ (2,5 eq, 1,2 mmol, 165 mg) y BzCl (1,1 eq, 0,53 mmol, 61 µL). La reacción se mantuvo en agitación a t.a. 18 h. Transcurrido este tiempo, la reacción se interrumpió por adición de 2 mL de H₂O y se extrajo con CH₂Cl₂ (3 × 10 mL). La fase orgánica combinada se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y evaporó. El crudo resultante se purificó por cromatografía flash automatizada utilizando una mezcla hexano/acetato de etilo (1/99) como eluyente, obteniéndose **13** como un sólido blanco, que por RMN correspondió con la benzoilación del alcohol primario y desprotección del acetal presente en **11** (37 mg, 26 %), con características espectrales análogas a lo descrito para esa estructura en la literatura.¹⁹⁰ P.f. 96–98 °C (lit. 99 °C),¹⁹⁰ [α]_D²⁵ –15,0 (*c* 1,11; CH₂Cl₂) (lit. –23,5; *c* 1,04; CHCl₃).¹⁹⁰

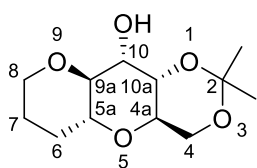
RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 8,10–7,98 (m, 2H, Ar), 7,53 (m, 1H, Ar), 7,41 (m, 2H, Ar), 5,83 (m, 2H, H₃, H₄), 4,37 (t, *J* = 6,3 Hz, 2H, H_{1'}), 4,30–4,19 (m, 1H, H₅), 4,11 (m, 1H, H₂), 3,82 (m, 2H, H_{1''}), 3,58–3,48 (m, 1H, H₆), 2,23 (bs, 2H, OH), 1,96–1,48 (m, 4H, H_{2'}, H_{3'}).

RMN de ¹³C (CDCl₃, 75,4 MHz) δ 166,9, 133,1, 130,9, 130,4, 129,7, 128,7, 128,5, 73,3, 72,2, 64,8, 64,1, 63,0, 29,6, 25,8.

Anal. Elem. calc. para C₁₆H₂₀O₅·1/2 H₂O: C, 63,77; H, 7,02. Encontrado: C, 63,40; H, 6,83.

EMAR (API-ES+) *m/z* calc. para C₂₃H₂₄O₅Na 315,1203 (M+Na⁺). Encontrado: 315,1196.

1.3.14. Síntesis de (4aR,5aR,9aS,10S,10aS)-2,2-dimetiloctahidro-4H-pirano[2',3':5,6]pirano[3,2-d][1,3]dioxin-10-ol (**14**)



Siguiendo el protocolo descrito por Shoji y col..¹⁹⁸ A una solución del alcohol **11** (781 mg, 3,42 mmol) en una mezcla de CH₂Cl₂ y tampón fosfato (PBS) a pH 7 (9:1, v/v, 24 mL) a 0 °C, se añadió ácido *m*-cloroperbenzoico (*m*-CPBA) (<70 %, 1,5 eq, 1,26 g, 5,13 mmol). La mezcla de reacción se mantuvo en agitación a t.a. 12 h, después de lo cual se interrumpió la reacción con solución acuosa saturada de Na₂SO₃ (20 mL), permitiendo la neutralización durante 30 min en agitación. Posteriormente, se decantó la fase orgánica y la fase acuosa se extrajo con CH₂Cl₂ (3 × 30 mL). La fase orgánica combinada se lavó con salmuera (20 mL), se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y evaporó, obteniéndose **14** como un aceite incoloro que no necesitó purificación cromatográfica (702 mg, 84 %). [α]_D²⁵ +15,0 (*c* 1,00; CH₂Cl₂).

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 4,15 (dd, *J* = 12,0, 3,0 Hz, 1H, H₁₀), 3,81 (dd, *J* = 10,8, 5,1 Hz, 1H, H_{10a}), 3,72–3,63 (m, 4H, H₄, H₈), 3,34 (d, *J* = 3,9 Hz, H_{5a}), 3,16 (m, 1H, H_{4a}), 3,03 (d, *J*

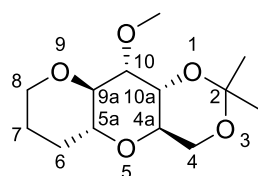
= 3,9 Hz, 1H, H9a), 2,16 (s, 1H, OH), 1,98–1,85 (m, 1H, H6), 1,80–1,62 (m, 4H, H6, H7), 1,50 (s, 3H, CH₃), 1,43 (s, 3H, CH₃).

RMN de ¹³C (75,4 MHz, CDCl₃) δ 100,5, 72,8, 68,7, 64,2, 63,5, 62,5, 55,0, 52,9, 29,3, 29,2, 26,5, 19,4.

Anal. Elem. calc. para C₁₂H₂₀O₅: C, 59,00; H, 8,25. Encontrado: C, 58,64; H, 8,17.

EMAR (API-ES+) *m/z* calc. para C₁₂H₂₀O₅Na 267,1203 (M+Na⁺). Encontrado: 267,1214.

1.3.15. Síntesis de (4aR,5aR,10S,10aR)-2,2-dimetiloctahidro-10-metoxi-4H-pirano[2',3':5,6]pirano[3,2-d][1,3]dioxina (15)



Seguendo el método descrito por Gensini y col.,¹⁹⁹ una disolución del alcohol **14** (684 mg, 3,05 mmol) en THF recién destilado (2 mL/mmol, 6,1 mL) se añadió gota a gota sobre una mezcla de NaH (60 % dispersión en aceite mineral, prelavada con hexano, 2,2 eq, 268 mg, 6,71 mmol) en

THF recién destilado (0,65 mL/mmol, 2 mL) a 0 °C. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación 30 min y posteriormente se adicionó CH₃I (1,4 eq, 266 µL, 4,27 mmol). Seguidamente, se retiró el baño de hielo y se dejó evolucionar la reacción a t.a. durante la noche. Al día siguiente, la reacción se interrumpió por dilución en Et₂O. La mezcla se centrifugó (750 rpm, 4 min) y el sólido resultante se decantó. El sobrenadante orgánico se lavó con H₂O (3 × 10 mL), se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y evaporó, obteniéndose **15** como un aceite incoloro que no necesitó purificación cromatográfica adicional (510 mg, 65 %).

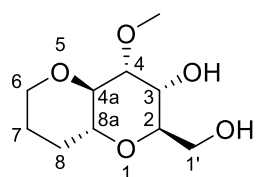
RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 4,06 (dd, *J* = 10,4, 4,4 Hz, 1H, H10a), 3,97 (m, 1H, H10), 3,75 (m, 1H, H4), 3,62 (m, 1H, H4), 3,57 (m, 1H, H5a), 3,43–3,30 (m, 3H, H4a, H8), 3,27 (d, *J* = 2,1 Hz, 3H, -OCH₃), 3,04 (m, 1H, H9a), 1,88–1,51 (m, 4H, H6, H7), 1,45 (s, 3H, CH₃), 1,37 (s, 3H, CH₃).

RMN de ¹³C (75,4 MHz, Acetona-*d*₆) δ 100,6, 100,3, 73,3, 73,0, 72,6, 71,7, 71,5, 69,5, 64,7, 63,8, 63,2, 62,6, 58,4, 56,0, 55,1, 53,0, 52,6, 27,3, 27,0, 27,8, 26,5.

Anal. Elem. calc. para C₁₃H₂₂O₅: C, 60,45; H, 8,58. Encontrado: C, 60,72; H, 8,59.

EMAR (API-ES+) *m/z* calc. para C₁₃H₂₂O₅Na 281,1359 (M+Na⁺). Encontrado: 281,1355.

1.3.16. Síntesis de (2R,3R,4R,8aR)-2-(hidroximetil)-4-metoxioctahidropirano[3,2-b]piran-3-ol (16)



A una disolución del acetal **15** (509 mg, 1,97 mmol) en una mezcla de CH₂Cl₂ y MeOH (1:1, v/v, 20 mL) bajo argón, se añadió la resina Dowex® 50WX8 (350 mg) a 0 °C. Se retiró el baño de hielo y la reacción se mantuvo en agitación 18 h. Después de este tiempo, se filtró y el sobrenadante se concentró a vacío. El crudo obtenido fue purificado mediante cromatografía flash

automatizada empleando una mezcla hexano/acetato (1/99) como eluyente, obteniendo **16** como un aceite incoloro (275 mg, 64 %). $[\alpha]^{25}_D +67,4$ (c 0,82; CH_2Cl_2).

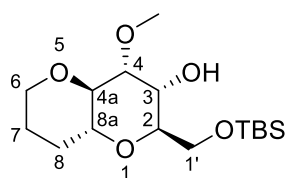
RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 4,03 (m, 1H, H4a), 3,91 (bt, $J = 8,6$ Hz, 1H, H2), 3,74 (m, 1H, H1'), 3,69 (m, 1H, H1'), 3,49 (dd, $J = 4,4, 1,9$ Hz, 1H, H3), 3,46–3,39 (m, 3H, H8a, H6), 3,32 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$), 3,20 (bd, $J = 8,4$ Hz, 1H, H4), 2,75 (bt, 1H, OH), 2,31 (bs, 1H, OH), 1,87–1,60 (m, 4H, H7, H8).

RMN de ^{13}C (75,4 MHz, CDCl_3) δ 72,5, 70,3, 70,1, 66,2, 62,6, 58,6, 58,0, 55,10, 25,9, 25,7.

Anal. Elem. calc. para $\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}_5 \cdot 1/3 \text{H}_2\text{O}$: C, 53,56; H, 8,39. Encontrado: C, 53,58; H, 8,31.

EMAR (API-ES+) m/z calc. para $\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}_5\text{Na}$ 241,1066 ($\text{M}+\text{Na}^+$). Encontrado: 241,1066.

1.3.17. Síntesis de (2R,3R,4R,8aR)-2-([(tert-butildimetilsilil)oxi]metil)-4-metoxioctahidropirano[3,2-b]piran-3-ol (17)



Siguiendo el protocolo descrito por Wipf y col.,²⁰⁰ con ligeras modificaciones. A una disolución del diol **16** (275 mg, 1,26 mmol) en trietilamina (TEA) (12 eq, 2 mL, 15,12 mmol) y 4-dimetilaminopiridina (4-DMAP) (0,02 eq, 3 mg, 0,02 mmol) a 0 °C se

adicionó cloruro de tert-butildimetilsililo (TBSCl) (1,1 eq, 210 mg, 1,39 mmol). A continuación, la reacción se mantuvo en agitación a t.a. durante 17 h. Pasado este tiempo, la reacción se interrumpió por dilución con Et_2O (10 mL) y se lavó sucesivamente con una disolución saturada de NH_4Cl (10 mL), una disolución saturada de NaHCO_3 (10 mL) y salmuera (10 mL). La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y evaporó, obteniendo **17** como un aceite incoloro que no necesitó purificación cromatográfica (307 mg, 73 %). $[\alpha]^{25}_D -2,2$ (c 0,97; CH_2Cl_2).

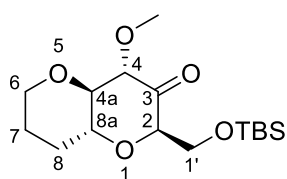
RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 4,10–3,96 (m, 1H, 4a), 3,94–3,71 (m, 2H, H4, H1'), 3,62 (m, 1H, H1'), 3,51–3,36 (m, 3H, H6, H3), 3,32 (d, $J = 3,0$ Hz, 3H, $-\text{OCH}_3$), 3,22 (m, 1H, H2), 3,01 (m, 1H, H8a), 1,95–1,53 (m, 4H, H7, H8), 0,89 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 0,09–0,05 (m, 6H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$).

RMN de ^{13}C (75,4 MHz, CDCl_3) δ 77,3, 72,6, 71,1, 69,4, 66,3, 58,7, 54,8, 52,6, 26,0, 25,8, 25,6, 18,3, -5,4, -5,5.

Anal. Elem. calc. para $\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_5\text{Si}$: C, 57,79; H, 9,70. Encontrado: C, 57,75; H, 9,47.

EMAR (API-ES+) m/z calc. para $\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_5\text{SiNa}$ 355,1911 ($\text{M}+\text{Na}^+$). Encontrado 355,1914.

1.3.18. Síntesis de (2R,4S,8aR)-2-([(tert-butildimetilsilil)oxi]metil)-4-metoxihexahidropirano[3,2-b]piran-3(2H)-ona (18)



Según el protocolo descrito por Fang y col.,²⁰¹ con modificaciones. A una disolución del alcohol **17** (307 mg, 0,92 mmol) en CH_2Cl_2 (50 mL) se añadió sucesivamente NaHCO_3 (100 eq, 7,73 g, 92,2 mmol) y triacetato de 3-oxo-1,3-dihidro-1 λ^5 ,2-benziodoxol-1,1,1-triilo

(periyodinano de Dess-Martin, DMP) (10 eq, 4,21 g, 9,92 mmol). La mezcla de reacción se mantuvo en agitación 14 h, después de lo cual se añadió más CH_2Cl_2 (20 mL) y la reacción se neutralizó con una mezcla de dos disoluciones saturadas de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ y NaHCO_3 (1:1, v/v, 50 mL). La mezcla se extrajo con CH_2Cl_2 (3 x 30 mL) y la fase orgánica combinada se lavó con H_2O y salmuera, se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y evaporó. El crudo resultante, un aceite amarillento, se empleó para la siguiente reacción sin necesidad de purificación cromatográfica (304 mg, >99 %). $[\alpha]^{25}_{\text{D}} -4,46$ (*c* 0,87; CH_2Cl_2).

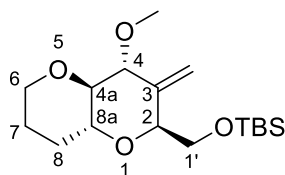
RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 4,44 (m, 1H, H2), 4,11 (m, 1H, H4a), 4,03–3,84 (m, 2H, H1'), 3,5 (d, *J* = 3,0 Hz, 1H, H4), 3,48–3,37 (m, 3H, H6, H8a), 3,34 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$), 1,90–1,66 (m, 4H, H7, H8), 0,87 (m, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 0,10–0,00 (m, 6H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$).

RMN de ^{13}C (75,4 MHz, CDCl_3) δ 203,7, 79,2, 72,4, 69,5, 66,6, 63,8, 58,7, 57,3, 53,6, 29,6, 25,8, 18,4, -5,3.

Anal. Elem. calc. para $\text{C}_{16}\text{H}_{30}\text{O}_5\text{Si}$: C, 58,15; H, 9,15. Encontrado: C, 57,76; H, 9,27.

EMAR (API-ES+) *m/z* calc. para $\text{C}_{16}\text{H}_{30}\text{O}_5\text{SiNa}$ 353,1755 ($\text{M}+\text{Na}^+$). Encontrado: 353,1800.

1.3.19. Síntesis de *tert*-butil([(2*S*,4*R*,8*aR*)-3-metilen-4-metoxioctahidropirano[3,2-*b*]piran-2-il]metoxi)dimetilsilano (19)



Según el procedimiento descrito por Fang y col..²⁰¹ A una solución de $\text{Ph}_3\text{PCH}_3\text{I}$ (3,7 eq, 703 mg, 1,74 mmol) en tolueno (5 mL, 2,9 mL/mmol) se añadió una solución de bis(trimetilsilil)amiduro de potasio (KHMDs) (3 eq, 2,8 mL, 0,5 M en tolueno, 1,42 mmol)

lentamente. La disolución amarilla resultante se calentó a 90 °C durante 30 min, tras lo cual se dejó enfriar hasta t.a., momento en el que se añadió una solución de la cetona **18** (156 mg, 0,47 mmol) en tolueno (5 mL, 10 mL/mmol) lentamente. La disolución se calentó a 90 °C y se mantuvo en agitación 45 min. La reacción se interrumpió por enfriamiento hasta t.a. y posterior adición de una disolución saturada de NH_4Cl (5 mL). La mezcla se concentró para eliminar el tolueno y se extrajo con acetato de etilo (3 x 15 mL). La fase orgánica combinada se lavó con salmuera (20 mL), se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y evaporó. El crudo se purificó por cromatografía flash automatizada utilizando una mezcla hexano/acetato de etilo (80/20) como eluyente, obteniéndose **19** como un aceite amarillo pálido (56 mg, 36 %). $[\alpha]^{25}_{\text{D}} -7,69$ (*c* 0,88; CH_2Cl_2).

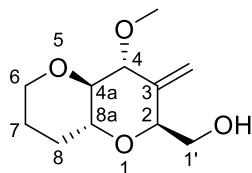
RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 5,37 (s, 1H, $=\text{CH}_2$), 5,27 (s, 1H, $=\text{CH}_2$), 4,16 (bdd, *J* = 7,0, 5,4 Hz, 1H, H2), 4,09 (m, 1H, H4a), 3,84 (dd, *J* = 10,6, 7,2 Hz, 1H, H1'), 3,64 (dd, *J* = 10,6, 5,5 Hz, H1'), 3,55 (d, *J* = 4,3 Hz, 1H, H4), 3,49–3,38 (m, 2H, H6), 3,33 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$), 3,23 (dd, *J* = 4,3, 1,2 Hz, 1H, H8a), 1,87–1,62 (m, 4H, H7, H8), 0,89 (bs, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 0,06 (s, 6H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$).

RMN de ^{13}C (75,4 MHz, CDCl_3) δ 139,2, 117,8, 73,1, 72,3, 69,2, 65,3, 58,7, 55,7, 53,2, 28,7, 27,7, 26,0, 25,8, 18,5, -5,1, -5,3.

Anal. Elem. calc. para $\text{C}_{17}\text{H}_{32}\text{O}_4\text{Si}$: C, 62,15; H, 9,82. Encontrado: C, 61,84; H, 9,53.

EMAR (API-ES+) m/z calc. para $C_{17}H_{32}O_4SiNa$ 351,1962 ($M+Na^+$). Encontrado: 351,1951.

1.3.20. Síntesis de [(2*S*,4*R*,8*aR*)-3-metilen-4-metoxioctahidropirano[3,2-*b*]piran-2-il]metanol (**20**)



Procedimiento basado en el descrito por Fang y col..²⁰¹ A una disolución de **19** (56 mg, 0,17 mmol) en THF recién destilado (2,5 mL, 15 mL/mmol) bajo argón se añadió fluoruro de tetrabutilamonio (TBAF) (255 μ L, 1 M en THF, 0,25 mmol). La reacción se mantuvo en agitación a t.a. durante

30 min. La reacción se interrumpió por dilución con acetato de etilo (5 mL) y neutralización con una disolución saturada de NH_4Cl (4 mL). Se decantaron las fases y la acuosa se extrajo con acetato de etilo (3×20 mL). La fase orgánica combinada se lavó con salmuera, se secó con Na_2SO_4 anhidro, filtró y evaporó. El crudo resultante se purificó por cromatografía flash automatizada utilizando una mezcla de hexano/acetato de etilo (50/50) como eluyente, obteniéndose **20** como un aceite incoloro (25 mg, 68 %). $[\alpha]^{25}_D +6,47$ (c 0,82; CH_2Cl_2).

RMN de 1H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 5,49 (s, 1H, =CH₂), 5,23 (s, 1H, =CH₂), 4,50 (m, 2H, H₂, H_{4a}), 3,99 (m, 1H, H_{1'}), 3,82 (m, 1H, H_{1'}), 3,57 (m, 1H, H₄), 3,48-3,37 (m, 2H, H₆), 3,34 (s, 3H, -OCH₃), 3,26 (m, 2H, H_{8a}), 2,61 (bs, 1H, OH), 2,11–1,61 (2m, 4H, H₇, H₈).

RMN de ^{13}C (75,4 MHz, $CDCl_3$) δ 140,3, 115,1, 79,8, 74,2, 72,4, 65,8, 60,8, 58,8, 31,3, 24,7.

Anal. Elem. calc. para $C_{11}H_{18}O_4 \cdot 1/4 H_2O$: C, 60,39; H, 8,52. Encontrado: C, 60,28; H, 8,48.

EMAR (API-ES+) m/z calc. para $C_{11}H_{18}O_4Na$ 237,1097 ($M+Na^+$). Encontrado: 237,1098.

1.4. Estudio computacional

El análisis de la conformación tridimensional (3D) de los compuestos estudiados se realizó por el método Monte Carlo con el programa Spartan 16 (Wavefunction, EE.UU.). En primer lugar, se dibujaron las moléculas y se perfilaron tridimensionalmente por métodos de mecánica molecular (*conformer distribution*), los cuales solo tienen en cuenta los electrones de la última capa de valencia para calcular la energía conformacional y diseñar los conformeros de menor estado energético. El conformero que presentó menor energía se optimizó por cálculos *ab initio* con la base Hartree-Fock 6-31G*. El conformero resultante que presentó energía más negativa fue el utilizado para los estudios de *docking* molecular.

La estructura 3D de la proteína PP2A co-cristalizada con AO se obtuvo de la base de datos *Protein Data Bank* (PDB ID: 2IE4; www.rcdb.org).²³ Esta estructura, con resolución de 3,5 Å, presenta la subunidad catalítica C y la subunidad reguladora A, así como el inhibidor AO coordinado en el sitio activo de la enzima. Para reducir el tamaño del cálculo matemático, las moléculas de H₂O de co-cristalización se eliminaron del complejo. Los cálculos de *docking*

molecular para PP2A y los compuestos seleccionados se llevaron a cabo mediante el programa Molegro Virtual Docker 3.2.1 (Molegro, Dinamarca).²⁰² Por último, para editar los resultados obtenidos del *docking* molecular se utilizó el visor molecular PyMOL, (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.2r3pre, Schrödinger, LLC.) apropiado para producir imágenes 3D de alta calidad de las moléculas con el conformero en la pose más adecuada y los aminoácidos de la diana biológica con los que interaccionan.²⁰³

1.5. Cálculo de los parámetros fisicoquímicos

Los valores de *clogP* a pH 7,4, el pK_a y el área de superficie polar (PSA, por sus siglas en inglés *polar surface area*) se obtuvieron con el programa Marvin Sketch 6.1.0. (ChemAxon, EE.UU.).

2. MATERIALES Y MÉTODOS DE EVALUACIÓN FARMACOLÓGICA

2.1. Materiales utilizados

El medio esencial mínimo de Eagle (EMEM, por sus siglas en inglés *Eagle's minimum essential medium*), medio F12, cóctel antibiótico de penicilina y estreptomina, gentamicina, L-glutamina, tripsina/EDTA, bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio (MTT), fingolimod, cisplatino, nicotina, memantina, rotenona, melatonina, AO, NaVO₃ y el dimetilsulfóxido (DMSO) de calidad biológica fueron suministrados por Sigma-Aldrich/Merck (Madrid, España). La oligomicina A y citostatina se obtuvieron de Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Alemania). El cóctel de aminoácidos no esenciales, suero fetal bovino (SFB), medio Neurobasal, medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, por sus siglas en inglés *Dulbecco's modified Eagle medium*) y el medio de cultivo RPMI 1640 se adquirieron en Gibco (Madrid, España). El kit Anexina V-FITC para detección de apoptosis se obtuvo de Immunostep (Salamanca, España). El kit de BCA Protein Assay para la cuantificación de proteínas se adquirió de Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, EE.UU.). El kit de fosfato de *p*-nitrofenol (*p*NPP) para medir la actividad fosfatasa se obtuvo de VWR (Oregon, EE.UU.). El kit ECL *Select Western Blotting Detection Reagent* fue suministrado por GE Healthcare (Amersham, UK). El material estéril (frascos de cultivos, tubos *Falcon*, pipetas y placas de cultivo) se obtuvo de Corning (Madrid, España). En la Tabla 1, se describen todos los anticuerpos utilizados en esta Memoria, especie, dilución utilizada y el proveedor donde se adquirieron.

Tabla 1. Relación de anticuerpos usados en la técnica de detección de proteínas *western blot*.

Anticuerpo	Especie	Dilución	Casa Comercial
anti-p-Akt (Ser473)	Conejo, monoclonal	1:2.000	Cell Signaling Technology
anti-Akt	Conejo, policlonal	1:2.000	Cell Signaling Technology
anti-Bax	Conejo, policlonal	1:2.000	Cell Signaling Technology
anti-CIP2A	Conejo, policlonal	1:2.000	BioRad
anti-p-ERK1/2 (Thr202, Tyr204)	Ratón, monoclonal	1:250	Santa Cruz Biotechnology
anti-ERK 1/2	Ratón, monoclonal	1:250	Santa Cruz Biotechnology
anti-GFP	Ratón, monoclonal	1:3.000	Santa Cruz Biotechnology
anti-p-GSK-3β (Ser9)	Conejo, policlonal	1:1000	Cell Signaling Technology
anti-GSK-3 β	Conejo, monoclonal	1:1000	Cell Signaling Technology
anti-p-tau (Ser202, Thr205)	Ratón, monoclonal	1:1.000	Thermo Fisher Scientific
anti-SET	Cabra, policlonal	1:1.000	Abcam

anti-β-actina	Conejo, monoclonal	1:1.000	Cell Signaling Technology
anti-goat IgG-HRP	Ratón	1:5.000	Santa Cruz Biotechnology
anti-mouse IgG-HRP	Cabra	1:5.000	Santa Cruz Biotechnology
anti-rabbit IgG-HRP	Cabra	1:5.000	BioRad

2.2. Mantenimiento de las células en cultivo

Los cultivos celulares se mantuvieron en un incubador de células a 37 °C con una atmósfera constante de 95 % de aire y 5 % de CO₂, saturada de humedad (91 %). Todos los procedimientos de manipulación de cultivos celulares se realizaron en condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar.

En el caso de los cultivos primarios, se hicieron todos los esfuerzos posibles para utilizar el mínimo número posible de animales y evitar su sufrimiento, de acuerdo a la directiva publicada por la Unión Europea para estos fines (2010/63/UE) y a las normas aprobadas por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina, UAM, según el RD53/2013, con las modificaciones indicadas en el RD1386/2018.

2.2.1. Línea celular de adenocarcinoma humano A549

Las células A549 son células de adenocarcinoma de pulmón de naturaleza escamosa ampliamente usadas en investigación. La línea celular A549 fue aislada por primera vez en 1972 por D. J. Giard y col. a partir de un adenocarcinoma de pulmón procedente del tumor de un paciente varón caucásico de 58 años.²⁰⁴ Estas células crecen *in vitro* adherentemente como una monocapa e *in vivo* pueden inducir tumores en ratones atímicos. Las células A549 poseen una mutación del gen *KRAS* (G12S, exón 2) pero mantienen el gen *EGFR* sin mutar, lo cual las convierte en un modelo celular resistente a los tratamientos con fármacos TKIs.²⁰⁵

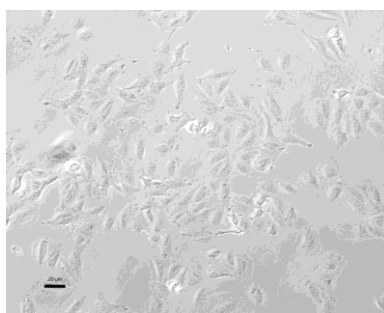


Imagen 1. Células de adenocarcinoma humano A549. La imagen fue realizada con un microscopio óptico en campo claro con un objetivo 10X usando una cámara DXM1200F digital asociada al microscopio Nikon TE2000-S.

La línea celular A549 fue empleada en esta Tesis para evaluar el impacto de uno de los compuestos descritos en este Memoria sobre la resistencia que presentan las células de cáncer de pulmón no pequeñas a fármacos antineoplásicos. Las células A549 se obtuvieron de la compañía ATCC (American Type Culture Collection; Manassas, VA, EE.UU.) y se cultivaron en medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con 10 % SFB (previamente inactivado por calor, 56 °C durante 30 min) y mezcla antibiótica penicilina/estreptomicina (1 %).

Para realizar los ensayos de evaluación de la toxicidad *per se*, se sembraron 2.000 células por pocillo en placas de 96 pocillos. Para los experimentos relativos a la medida de apoptosis por citometría de flujo, se empleó una densidad celular de 150.000 células, sembradas en placas petri de 60 mm de diámetro. Por último, para llevar a cabo los experimentos de *immunoblot*, se sembraron 400.000 células en placas petri de 100 mm de diámetro. Las células utilizadas en estos experimentos se encontraban en número de pase bajo (4 a 10).

2.2.2. Línea celular HEK 293T embrionaria de riñón humano

Esta línea celular, debido a su fácil transfección, es de uso muy extendido en estudios de expresión heteróloga de proteínas o de producción de partículas víricas en ingeniería genética. La línea celular HEK 293 deriva de células de epitelio renal humano transformadas con el gen *E1A* de adenovirus.²⁰⁶ La línea celular HEK 293T es un derivado de la HEK 293 que expresa además el antígeno T largo del virus SV40, que permite la replicación episomal de los plásmidos que contengan un origen y región promotora temprana de SV40.²⁰⁷

En esta Tesis, las células HEK 293T se emplearon para transfectar distintas subunidades de la proteína PP2A. Las células HEK 293T se obtuvieron de la compañía ATCC y se cultivaron en medio DMEM suplementado con 10 % SFB inactivado y 1 % de penicilina/estreptomicina. Para transfectar el plásmido y posteriormente llevar a cabo la inmunoprecipitación y medida de actividad fosfatasa, se sembraron 1×10^6 células en placas petri de 100 mm de diámetro. Las células utilizadas en estos experimentos se encontraban en número de pase bajo (4 a 20).

2.2.3. Línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y

La línea celular SH-SY5Y es un modelo ampliamente empleado para realizar experimentos *in vitro* que requieran células de tipo neuronal, ya que presenta alta capacidad proliferativa, es fácilmente manipulable y sensible a la exposición de diversos tóxicos.²⁰⁸ Esta línea celular, proveniente de un neuroblastoma metastásico de una niña de 4 años, fue desarrollada por J. L. Biedler en 1970 como un subclón de la línea SK-N-SH.²⁰⁹ Las células SH-SY5Y presentan un fenotipo neuronal, en cultivo crecen principalmente en monocapa adheridas a superficie, con tendencia a agregarse, y presentan una morfología tipo epitelial con pequeñas prolongaciones, pudiendo ser diferenciadas a un fenotipo neuronal más maduro con el tratamiento de diferentes sustancias, siendo el ácido retinoico el usado más frecuentemente.²¹⁰ Las células SH-SY5Y no

diferenciadas poseen actividad Tyr-hidroxilasa,²¹¹ así como transportador de dopamina y sus receptores tipo 2 y 3,²¹² receptores muscarínicos y nicotínicos,²¹³ canales de Ca^{2+} , Na^{+} y K^{+} dependientes de voltaje,^{214, 215} receptores purinérgicos P2X7²¹⁶ y receptores opioides.²¹⁷

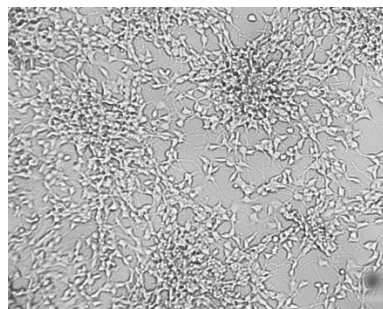


Imagen 2. Células de neuroblastoma humano SH-SY5Y.

La línea celular SH-SY5Y es utilizada en esta Tesis para evaluar el perfil neuroprotector de los compuestos.²⁰⁸ Estas células se obtuvieron de la compañía ATCC. Son mantenidas en un medio de cultivo constituido por una mezcla de nutrientes EMEM y F12 (1:1) enriquecido con SFB al 10 % (inactivado, 56 °C, 30 min) y suplementado con penicilina/estreptomicina (100 UI/mL y 100 µg/mL, respectivamente), aminoácidos no esenciales (0,1 mM), NaHCO_3 (23 mM) y piruvato sódico (1 mM).

Para los ensayos de neuroprotección y medida de la actividad fosfatasa, las células se sembraron en placas de 48 pocillos a una densidad de 70.000 células/pocillo. Las células utilizadas en estos experimentos se encontraban en número de pase bajo (8 a 20).

2.2.4. Cultivo primario de neuronas de corteza total de embrión de rata

El medio de cultivo para las neuronas de corteza total de embrión de rata se preparó con medio Neurobasal suplementado con B-27 (2 %), L-glutamina, gentamicina (0,5 mg/L) y penicilina/estreptomicina (100 UI/mL y 100 µg/mL, respectivamente). El B-27 es un suplemento optimizado sin suero que se utiliza para favorecer la viabilidad neuronal en detrimento de la glía. El cultivo de neuronas de corteza de embrión de rata se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Yáñez y col.,²¹⁸ con ligeras modificaciones. En primer lugar, se obtuvieron los embriones por cesárea de una rata preñada de 18 o 19 días de gestación. Los embriones se decapitaron y se extrajeron los cerebros, de los que se retiraron las meninges. La corteza cerebral se diseccionó y sumergió en una solución de tampón fosfato salino de la siguiente composición (mM): NaCl 137, KCl 3, Na_2HPO_4 10, KH_2PO_4 2, albúmina de suero bovino (BSA) 4 y glucosa 1,5, ajustada a pH 7,4. Tras la disección de las cortezas de todos los embriones, estas se juntaron y disgregaron mecánicamente. El número de neuronas obtenido se contó utilizando el colorante vital azul tripano. Las neuronas se resuspendieron en medio Neurobasal y se sembraron en placas de 48 pocillos, previamente tratadas con poli-D-lisina para facilitar la adhesión de las neuronas a la

superficie de los pocillos, a una densidad de 30.000 neuronas/pocillo y se dejaron madurar durante 8–10 días, hasta que se observó una red neuronal densa, sin ser necesario cambiar el medio.

2.3. Experimentos de evaluación farmacológica

2.3.1. Evaluación de la toxicidad per se

Para evaluar la toxicidad de los compuestos sintetizados en esta Tesis, las células A549, SH-SY5Y y neuronas de corteza cerebral de embrión de rata fueron expuestas a los compuestos 24 h después de su siembra, en el caso de las líneas celulares, y a los 8 días en el caso del cultivo primario. Después de 48 h de tratamiento, se midió la viabilidad celular por el método de reducción de MTT, explicado más adelante. Los compuestos se evaluaron a distintas concentraciones, según se expresa en las figuras.

2.3.2. Experimentos de neuroprotección en células SH-SY5Y

Con el fin de evaluar el efecto neuroprotector de los compuestos sintetizados en esta Tesis, las células de neuroblastoma humano SH-SY5Y fueron preincubadas durante 24 h con los compuestos a evaluar, en medio con 10 % SFB. Después de 24 h de preincubación, se coincubaron con los compuestos y el correspondiente tóxico (AO 20 nM, rotenona y oligomicina A 30 μ M y 10 μ M, o citostatina 2,5 μ M), cambiando el medio de cultivo por medio fresco suplementado con 1 % SFB. Transcurridas 20–24 h, la viabilidad celular fue evaluada por el método de reducción de MTT.

2.3.3. Experimentos de neuroprotección en neuronas de corteza total de embrión de rata

Los cultivos de neuronas se preincubaron con los compuestos a evaluar a una concentración de 1 μ M, en un medio Neurobasal y pipeteados directamente en los pocillos (sin retirar el medio), durante 24 h. Transcurridas 24 h, los cultivos se expusieron a glutamato 50 μ M, manteniendo el estímulo tóxico durante 24 h, después de lo cual se midió la viabilidad celular por el método de reducción de MTT.

2.3.4. Evaluación de la viabilidad celular mediante el método de reducción de MTT

Se trata de un ensayo colorimétrico que permite evaluar la viabilidad celular de forma rápida, económica y sencilla. Este método se basa en la reducción química del MTT o bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio, de coloración amarilla y soluble en medio acuoso, por las enzimas mitocondriales deshidrogenasas de las células viables, dando lugar a

formazán, de color morado e insoluble en el medio (Figura 26). Por tanto, la cantidad de formazán producido, medido en función de la intensidad colorimétrica, es directamente proporcional al número de células viables.

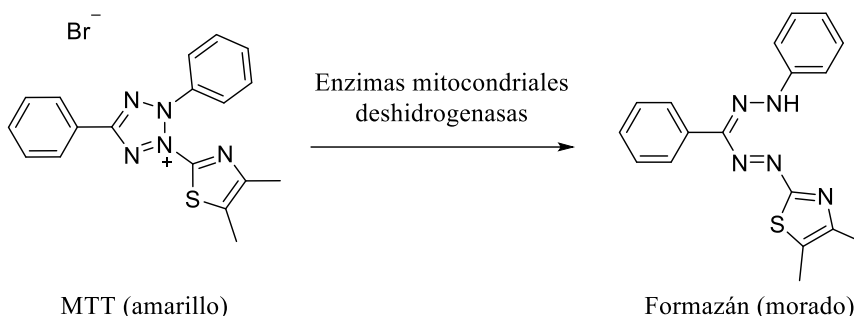


Figura 26. Reducción de MTT a formazán.

Para realizar este método, el MTT, disuelto en agua (12 mM), se añade a los pocillos (concentración final 1,2 mM) y se incuba a 37 °C y oscuridad durante 3 h en el caso de las células A549, 2 h en el caso de las células SH-SY5Y o 30 min para las neuronas de corteza de embrión de rata. Posteriormente, se retira el medio y se añade DMSO con el fin de lisar las células y solubilizar el formazán. La absorbancia de la solución colorimétrica se mide a 540 nm en el lector de placas FluoStar Optima (BMG, Alemania). La señal colorimétrica es proporcional al número de células cuya mitocondria sea funcional.

2.3.5. Evaluación de la actividad fosfatasa mediante el método del pNPP

El fosfato de *p*-nitrofenol (pNPP) es un sustrato cromogénico para la mayoría de enzimas fosfatasas. Al introducirse en las células, es hidrolizado por enzimas fosfatasas generando *p*-nitrofenol, el cual, en condiciones alcalinas, produce *p*-nitrofenolato. Este metabolito, de color amarillo con un máximo de absorbancia a 405 nm, es cuantificado espectrofotométricamente. La señal colorimétrica es proporcional a la actividad fosfatasa capaz de catalizar la reacción descrita (Figura 27). En presencia de inhibidores específicos de Ser/Thr fosfatasas, como AO o citostatina, se acepta que los cambios en la absorbancia se deben a la actividad de estas enzimas.²¹⁹

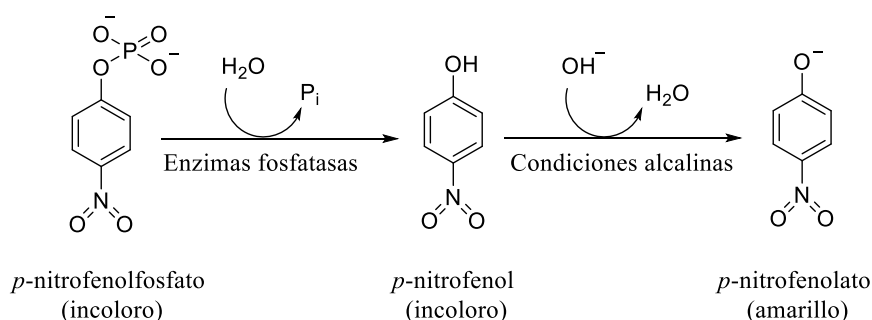


Figura 27. Desfosforilación del pNPP por parte de enzimas fosfatasas en medio alcalino.

Para medir la actividad fosfatasa por el método del *pNPP* se utilizó el kit *Biosciences Phosphatase Assay*, que proporciona el sustrato de reacción y el tampón para la reacción enzimática. Después de la coincubación de los compuestos y el tóxico, se retira el medio de cultivo de los pocillos y se añaden 100 μ L por pocillo de una mezcla 1:1 de sustrato y tampón de reacción, siendo la concentración final de *pNPP* en los pocillos de 10 mM. Los pocillos con la mezcla de reacción se incubaron en oscuridad a 37 °C durante 30 min, después de los cuales se midió la absorbancia a 405 nm en un lector de placas FluoStar Optima. Para la medida de la actividad Ser/Thr fosfatasa se añadió el tampón con NaVO_3 (1 mM), inhibidor selectivo de Tyr fosfatasas.

2.3.6. Preparación de los plásmidos, transfección de células HEK 293T e inmunoprecipitación de PP2A

La preparación de los plásmidos se realizó a partir de las células competentes DH5- α , células de *E. coli* diseñadas para maximizar la eficiencia de la transformación. Estas células, que deben su nombre al biólogo estadounidense D. Hanahan, presentan tres mutaciones que ayudan a la inserción del plásmido. La extracción del ADN amplificado de naturaleza plasmídica de un cultivo bacteriano se llevó a cabo por el método de Midiprep, siguiendo las instrucciones del fabricante (Thermo Fisher Scientific, EE.UU.).

Las células HEK 293T se transfectaron con vectores de expresión de distintas subunidades de PP2A marcadas con la proteína GFP, utilizando polietilenimina (PEI) como reactivo de transfección, siguiendo un protocolo estándar. Tras 48 h de transfección, se retiró el medio, se lavaron las células con solución salina tamponada con Tris (TBS, del inglés *Tris-buffered saline*) y se lisaron con 200 μ L tampón NET de la siguiente composición (mM): Tris-HCl 50, NaCl 150 y EDTA 15, con 1 % NP-40 y ajustado a pH 7,4, suplementado con el cóctel completo de inhibidor de proteasas (Roche Applied Science). El lisado se centrifugó 15 min a 4 °C y $13.000 \times g$.

Para los experimentos de *pull-down* o inmunoprecipitación de PP2A, los lisados celulares fueron incubados con 30 μ L de GFP-trapping beads (ChromoTek) y 500 μ L de tampón NENT100 de la siguiente composición (mM): Tris-HCl 20, EDTA 1, NaCl 100; y con 0,1 % de NP-40 y 25 % de glicerol, ajustado a pH 7,4 y suplementado con 1 mg/mL de BSA en una rueda giratoria durante 1 h a 4 °C. A continuación, los *beads* se lavaron dos veces en tampón NENT100 con BSA y dos veces más en tampón NENT300 con NaCl 300 mM. Estos *beads*, que son las diferentes isoformas de la proteína PP2A-GFP inmunoprecipitadas, se emplearon en el ensayo de actividad fosfatasa de verde malaquita, descrito en el siguiente apartado. Además, se comprobó por *western blot* (según se describe más adelante) que los *beads* inmunoprecipitados contenían las subunidades correspondientes a las isoformas transfectadas. Para ello, las proteínas junto con el tampón de carga (*sample buffer*) Nupage (Invitrogen) se calentaron a 98 °C durante 10 min, se cargaron en geles SDS-PAGE Bis-Tris (BioRad) al 4–12 % (p/v) y se separaron por tamaño mediante electroforesis. Las membranas se bloquearon en leche al 5 % en TBS y Tween-20 al 0,1

% a t.a. durante 1 h, y se incubaron con los anticuerpos primarios oportunos a 4 °C durante la noche. Después de lavarlas en TBS y Tween-20 al 0,1 %, las membranas se incubaron a t.a. durante 1 h con anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano picante (HRP) y se revelaron en un sistema ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare) con un kit de detección ECL. La cuantificación densitométrica se realizó con ImageJ (NIH, EE. UU.).

2.3.7. Ensayo de actividad PP2A: Método verde malaquita

El método de verde malaquita es un método sensible para la detección de fosfato liberado. Este ensayo se basa en la cuantificación de la absorbancia del complejo verde formado entre el verde de malaquita, el molibdato amónico y el ortofosfato libre (P_i) (Figura 28).

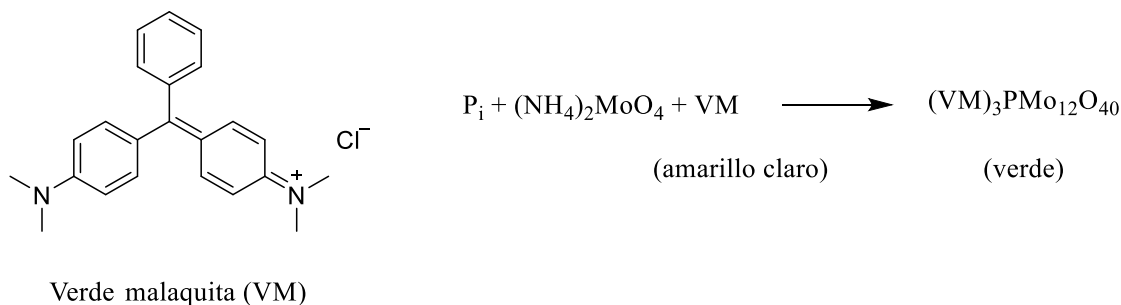


Figura 28. Reacción colorimétrica entre el verde malaquita y el molibdato amónico procedentes del reactivo comercial BIOMOL Green y el fosfato libre procedente del fosfo-péptido K-R-pT-I-R-R.

Después de inmunoprecipitar los complejos PP2A-GFP, estos se lavaron con 500 μ L de Tris-HCl 20 mM (pH 7,4) y TrisDTT 1 mM, y se resuspendieron en 100 μ L de solución TrisDTT. A continuación, se diluyeron 20 μ L de cada complejo PP2A-GFP para obtener la concentración deseada, y se preincubaron (o no en la situación control) 10 min en hielo con AO y/o con el compuesto **1** o **9**. Seguidamente, se añadieron 10 μ L del fosfo-péptido K-R-pT-I-R-R (2 mM) y se incubó la mezcla a 30 °C durante 15–30 min (intervalo de tiempo dentro del rango lineal del ensayo). El fosfato libre liberado se determinó mediante la adición de BIOMOL Green (BMLAK111-0250, Enzo, Nueva York, EE.UU.). Tras 10 min de incubación a t.a., se midió la absorbancia a 630 nm en un espectrofotómetro multicanal Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific). Por último, se obtuvo la actividad fosfatasa específica al corregir la absorbancia medida con la cantidad de subunidad C extraída con la subunidad B-GFP, determinada por *immunoblot* con anticuerpos anti-C y cuantificada por ImageJ.

2.3.8. Determinación de la apoptosis por citometría de flujo

La capacidad del cisplatino de inducir apoptosis en células A549 se analizó utilizando la sonda proporcionada en el kit, Anexina V-FITC, combinada con yoduro de propidio (PI). La Anexina V es capaz de detectar las células que expresan fosfatidilserina en su membrana celular,

una característica observada en la célula apoptótica. Por otro lado, el PI marca el ADN nuclear de las células necróticas con disrupciones en la membrana plasmática.²²⁰

Tras 24 h desde la siembra de las células, estas se pretrataron o no (basal) con nicotina (1 μ M) y/o el compuesto **1** (50 μ M) durante 24 h. Posteriormente, las células se incubaron con cisplatino (10 μ M) en ausencia o presencia de nicotina y/o compuesto **1** por un periodo de 48 h. Tras los tratamientos, las células se tiñeron con el kit *Annexin V-FITC Apoptosis Detection*, según las instrucciones del fabricante. Las células en suspensión o adheridas a la placa fueron recogidas, lavadas y resuspendidas en la solución apropiada para el marcaje con Anexina (1X). A continuación, se añadieron 3 μ L de Anexina V-FITC y 3 μ L de PI a la suspensión celular y se incubó a t.a. durante 15 min en oscuridad. Finalmente, se analizó la apoptosis en cada condición experimental (10.000 células por condición) por citometría de flujo con el citómetro FC500 MPL Flow Cytometer (Beckman Coulter). El porcentaje sumatorio de células en apoptosis temprana [Anexina (+); PI (-)] y tardía [Anexina (+); PI (+)] se consideró como la proporción de apoptosis total.

2.3.9. Detección de la expresión proteica celular por western blot

El análisis de expresión proteica se realizó mediante la técnica de *immunoblot*, tal como ha sido descrito por nuestro grupo.^{221, 222} La proteína total se extrajo de las células usando el tampón de lisis celular NP-40 conteniendo un cóctel de inhibidores de proteasas y fosfatasa. El extracto proteico se cuantificó con el kit *BCA Protein Assay*, siguiendo las instrucciones del fabricante. El sobrenadante con el extracto proteico se almacenó a -80°C hasta su uso. Las proteínas (~ 50 μ g/muestra) se cargaron en un gel de 10 % SDS-PAGE y separaron por tamaño mediante electroforesis. Las proteínas del gel se transfirieron a membranas de difluoruro de polivinilo (PVDF). Para evitar uniones inespecíficas de los anticuerpos, las membranas se bloquearon 1 h con solución de TTBS con 5 % de leche descremada o con 4 % de BSA, dependiendo del anticuerpo usado. A continuación, las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios a t.a. durante 2 h, se lavaron 3 veces con TTBS (1X), se incubaron a t.a. 1 h con el anticuerpo secundario IgG correspondiente (1:5.000) conjugado con HRP y se lavaron 3 veces con TTBS (1X). Las proteínas de interés se detectaron con el kit *ECL Select Western Blotting Detection* en el equipo ChemiDoc XRS+ (BioRad). La cuantificación de la densidad de las bandas proteicas se realizó con el programa ImageJ, utilizando la proteína β -actina como control de carga.

2.4. Análisis estadístico y representación de los datos

Todos los datos presentados son resultado de al menos cuatro experimentos independientes, cada uno por triplicado. Los valores se presentan como las medias \pm error estándar de la media.

Las diferencias estadísticas entre grupos experimentales y el control se realizaron mediante un análisis de la varian za (ANOVA) seguido de un análisis *post hoc* Newman-Keuls o Dunnett. Las diferencias entre los grupos se consideraron estadísticamente significativas si $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**) y $p \leq 0,001$ (***). Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa GraphPad Prism 8.3. (California, EE. UU.).

El % de *Viabilidad* celular se calcula tomando como 100 % el promedio de las absorbancias obtenidas en las células sin tratamiento, aplicando la siguiente fórmula:

$$\% Viabilidad = \frac{Absorbancia\ media\ células\ tratadas}{Absorbancia\ media\ células\ control} \times 100$$

El % de *Actividad fosfatasa* se calcula tomando como 100 % el promedio de las absorbancias obtenidas en las células sin tratamiento, aplicando la siguiente fórmula:

$$\% Actividad\ fosfatasa = \frac{Absorbancia\ media\ células\ tratadas}{Absorbancia\ media\ células\ control} \times 100$$

El % de *Protección* se calcula tomando como 100 % el promedio de la muerte celular obtenida en los pocillos tratados únicamente con el tóxico, aplicando la siguiente fórmula:

$$\% Protección = 100 - \left(\frac{\% muerte\ células\ con\ tóxico\ y\ compuesto}{\% muerte\ células\ solo\ tóxico} \times 100 \right)$$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. BÚSQUEDA Y DISEÑO DE NUEVOS COMPUESTOS ACTIVADORES DE PP2A

1.1. Relación estructura-actividad del ácido okadaico y otros inhibidores selectivos de PP2A

En la búsqueda de nuevos compuestos con efecto activador de PP2A, el presente trabajo de investigación comenzó con el estudio de la relación estructura química–actividad farmacológica del AO, con el fin de determinar qué partes le aportaban mayor potencia inhibidora y si había motivos estructurales que únicamente contribuían a aumentar la afinidad y/o selectividad hacia este subtipo de PPP.

En la base de datos *Protein Data Bank* (PDB; www.rcsb.org) se encuentran depositadas diversas estructuras de PP2A obtenidas por Rayos X con alguna de las subunidades B reguladoras (por ejemplo, la B') y co-cristalizadas con varias de sus enzimas reguladoras (PTPA, LCMT-1 o PME-1) o con sus inhibidores exógenos (AO, microcistina-LR o dinofixina-1 y -2). Sin embargo, aún no se ha conseguido por rayos X la estructura de un co-cristal PP2A–inhibidor endógeno. Para el diseño y predicción computacional de la actividad de los nuevos ligandos de PP2A propuestos en esta Tesis Doctoral, se seleccionó la estructura de rayos X de PP2A depositada con el código 2IE4 (Figura 29) procedente de *Homo Sapiens*, la cual posee las subunidades catalítica C (36 kDa) y estructural A (72 kDa) con la isoforma del tipo α para ambos casos, co-cristalizada con AO. Se eligió esta estructura por la mayor prevalencia de las isoformas C α y A α en mamíferos. La subunidad C α es 10 veces más abundante que la β con la que, en cualquier caso, comparte un 97 % de homología. En el caso de la subunidad A, la isoforma α es 9 veces más abundante que la β , con la que comparte un 87 % de homología.²²³ La resolución del cristal nos indica una precisión de la nube electrostática de 2,6 Å, adecuada para nuestro estudio.

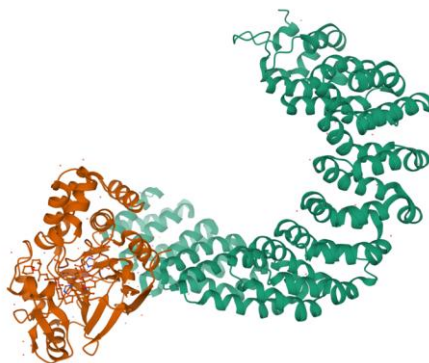


Figura 29. Estructura 2IE4 con la holoenzima de PP2A unida a AO. En naranja la subunidad catalítica C, en verde la subunidad estructural A. Tomada de la base de datos *Protein Data Bank* (www.rcsb.org).

A excepción de PME-1, que en ocasiones actúa como un inhibidor uniéndose directamente al sitio activo de PP2A,²²⁴ se desconoce el mecanismo por el que los inhibidores endógenos de la enzima, como CIP2A o SET, se unen a esta. Hasta la fecha, solo se ha descrito la interacción de inhibidores exógenos con el bolsillo de unión en PP2Ac. Tal es el caso de microcistina-LR o AO. Para el AO, inhibidor que tomamos como referencia para el diseño de ligandos, se han identificado en su estructura los siguientes grupos farmacóforos (Figura 30), los cuales están presentes en la mayoría de los inhibidores de Ser/Thr fosfatasas:²²⁵

1. Grupo ácido (fosfórico, carboxílico o su anhídrido), responsable de la interacción de AO con los metales del grupo prostético de la enzima imitando al grupo fosfato de la proteína sustrato.
2. Grupo metilo (sobre C2) próximo al grupo ácido terminal (C1), encargado de simular el metilo presente en un residuo de fosfotreonina.
3. Segmento grande hidrofóbico (de C16 a C38), capaz de simular los residuos de aminoácidos hidrófobos próximos a los residuos de fosfotreoninas en las proteínas sustrato.

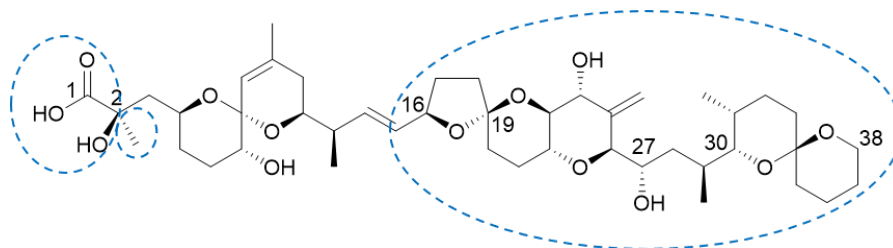


Figura 30. Estructura química del ácido okadaico con sus tres grupos farmacóforos.

Gracias a los estudios de la relación estructura-actividad (SAR, del inglés *structure-activity relationship*) de la unión de AO con PPP, se han identificado dos sitios clave de reconocimiento molecular: un bolsillo donde se encuentran los dos iones metálicos de las PPP, el cual acomoda la región espiroacetal C3–C12 de AO, y un bolsillo distal formado por aminoácidos hidrofóbicos que aloja el espiroacetal de la cola terminal C30–C38 de AO.^{226, 227} El ácido carboxílico (C1) de AO, que se une cerca del sitio activo (Tyr265 y Arg89 en PP2A, o Tyr272, Arg96 e His125 en PP1),^{23, 228} es el principal farmacóforo con responsabilidad inhibitoria. El AO se posiciona en el sitio catalítico de la subunidad C, muy próximo a los dos iones Mn^{2+} , pero lejos de las repeticiones HEAT donde se unen las subunidades A y C. La unión del AO se establece mediante enlaces de hidrógeno entre los oxígenos de su estructura y los hidrógenos que donan Arg89 y Tyr265 de PP2A. Esta interacción con el AO se refuerza con numerosas interacciones de tipo Van der Waals, participando Leu243, Tyr265, Cys266, Arg268 y Cys269. Se ha descrito que modificaciones estructurales en C1 y C2 pueden reducir la potencia inhibitoria de derivados de AO en varios órdenes de magnitud. Este es el caso de la eliminación del grupo hidroxilo en C2 de AO, lo cual

reduce 30 veces su potencia inhibidora sobre PP2A y 6 veces sobre PP1.²²⁹ Por otra parte, modificaciones estructurales y estereoquímicas en la región del fragmento terminal C16–C38 de AO tienen menor efecto sobre la unión al bolsillo hidrofóbico de PPP.²²⁹ Así, la afinidad por PP2A de la dinofisistoxina-2, que solo difiere del AO en la presencia de un metilo en C35, es solo 2 veces inferior.²³⁰ En el extremo del bolsillo de unión, los aminoácidos de PP2Ac, Gln122, Ile123, His191 y Trp200, forman un bolsillo hidrofóbico que acomoda el extremo hidrofóbico de AO. Es precisamente en esa cavidad donde radica la diferente selectividad del AO por PP1 y PP2A, puesto que PP1 carece de ella, y por ello el AO interacciona con menor afinidad con esta.

Otras toxinas naturales con actividad inhibidora sobre PP2A, como la fostriecina y la citostatina, interaccionan con PP2A de forma similar a como lo hace AO (Figura 31). La lactona presente en fostriecina y citostatina interacciona con el bucle β 12– β 13 estabilizando esta unión por interacciones hidrofóbicas con residuos cercanos de la misma naturaleza (Tyr267). Así, esta lactona α,β -insaturada, químicamente activada por la generación de un enlace de hidrógeno con Arg268, es susceptible de interaccionar con la Cys269 por adición conjugada, que está presente cerca del sitio activo de PP2A y PP4, pero ausente en PP1, PP2B, PP5 o PP7. Por otro lado, se establece un enlace de hidrógeno entre el hidroxilo de C11 de fostriecina y citostatina y la Arg214 de PP2A (Figura 32). Otra interacción destacada de fostriecina es el enlace de hidrógeno establecido entre el hidroxilo de C8 y la Asp57, lo que favorece la coordinación al catión metálico próximo. De esta manera, se desaloja la molécula de agua del sitio activo, la cual es necesaria para realizar la hidrólisis del fosfato. Todo este movimiento concertado sitúa el grupo metilo de C8 de fostriecina en un bolsillo hidrofóbico, potencialmente reservado para el grupo metilo presente en sustratos de fosfotreonina, lo que exacerba su potencial inhibidor.^{231, 232}

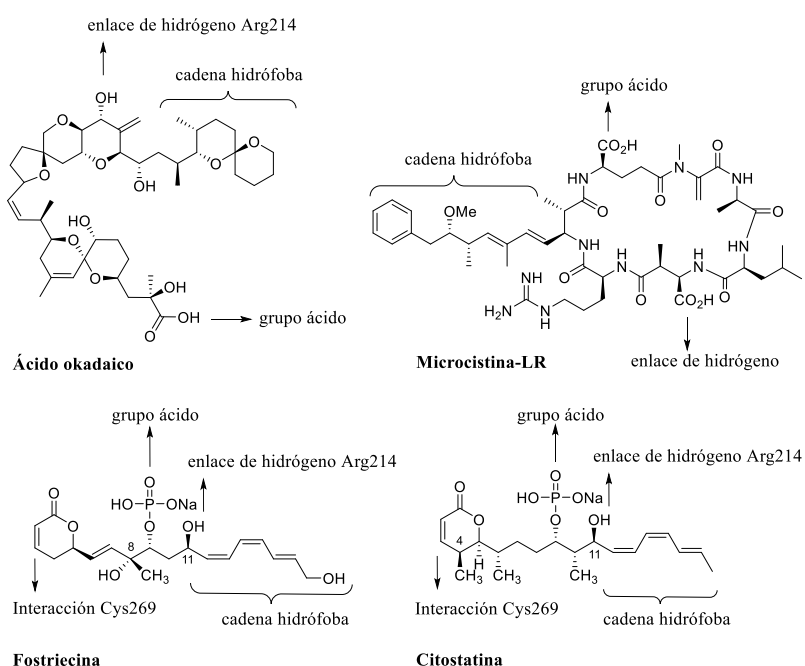


Figura 31. Elementos de unión a PP2A compartidos por diversos inhibidores naturales de la enzima.

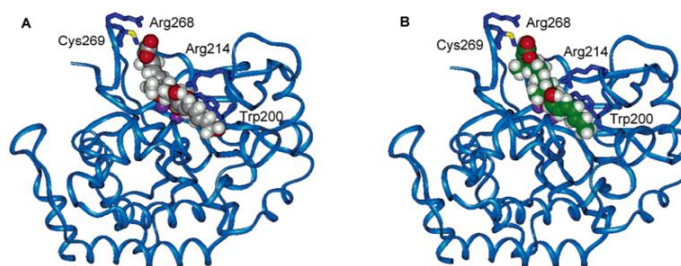


Figura 32. Modelos de unión de fostriecina (A) y citostatina (B) a PP2Ac. Tomada de Lawhorn y col., 2006.²³¹

Por otro lado, es importante considerar que, en condiciones fisiológicas, el AO se pliega sobre sí mismo mediante enlaces de hidrógeno intramoleculares proporcionándole una disposición adecuada para que el ácido carboxílico impida la actividad fosfatasa de PP2A mediante el bloqueo del acceso de los sustratos al sitio catalítico (Figuras 33 y 34).²²⁹

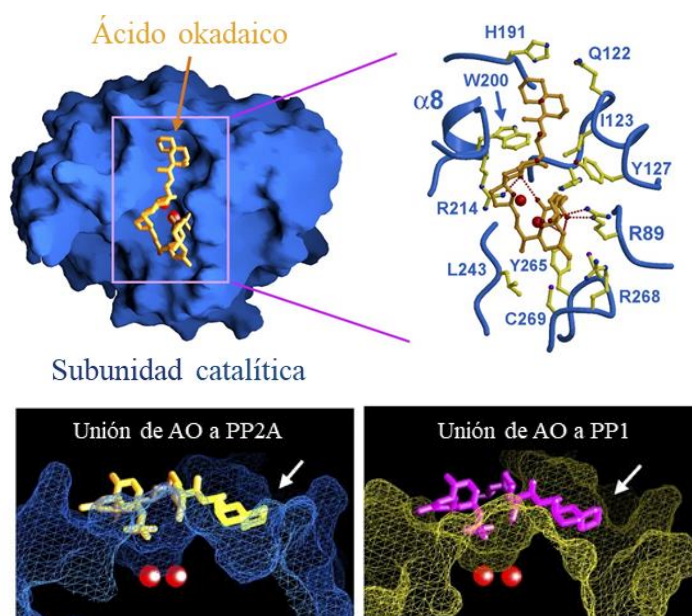


Figura 33. (Superior) Unión del AO a PP2Ac y aminoácidos que participan en la interacción. (Inferior) Unión de AO a PP2A y PP1. Modificadas de Xing y col., 2006.²³

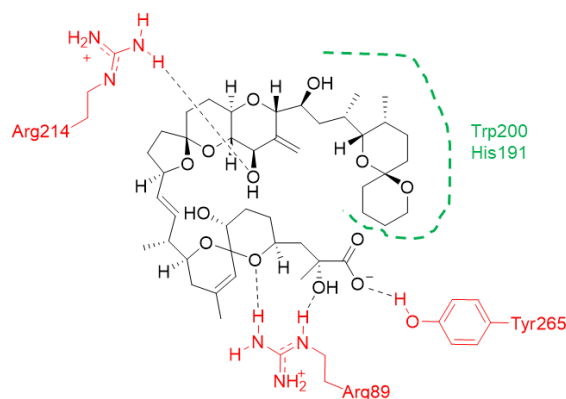


Figura 34. Interacciones más significativas entre AO y PP2Ac.

1.2. Diseño de análogos de ácido okadaico carentes de potencial inhibitor

Para el diseño de los derivados de AO se aplicaron los conocimientos derivados del anterior estudio SAR. Según las observaciones encontradas en dicho estudio, nuestra hipótesis propone que el desarrollo de ligandos activadores de PP2A basados en una estructura truncada de AO debe evitar el acercamiento a los residuos Tyr265, Arg89, Tyr127, Cys269, Leu243, Arg268 y Arg214, que conforman el sitio de unión a los sustratos fosforilados. En contraposición, interacciones con los residuos que forman la cavidad hidrófoba, es decir, Trp200, His191, Gln122 e Ile123, serían favorables para nuestro propósito ya que aumentarían la afinidad y la selectividad por PP2A, sin afectar a su actividad enzimática.

En base a lo anterior, seleccionamos el fragmento central C19–C27 del AO como base para diseñar ligandos con potencial afinidad por PP2A y que carecieran de los motivos estructurales inhibidores de la actividad fosfatasa y, por ende, con capacidad de competir con inhibidores endógenos en su unión a PP2A (Figura 35).

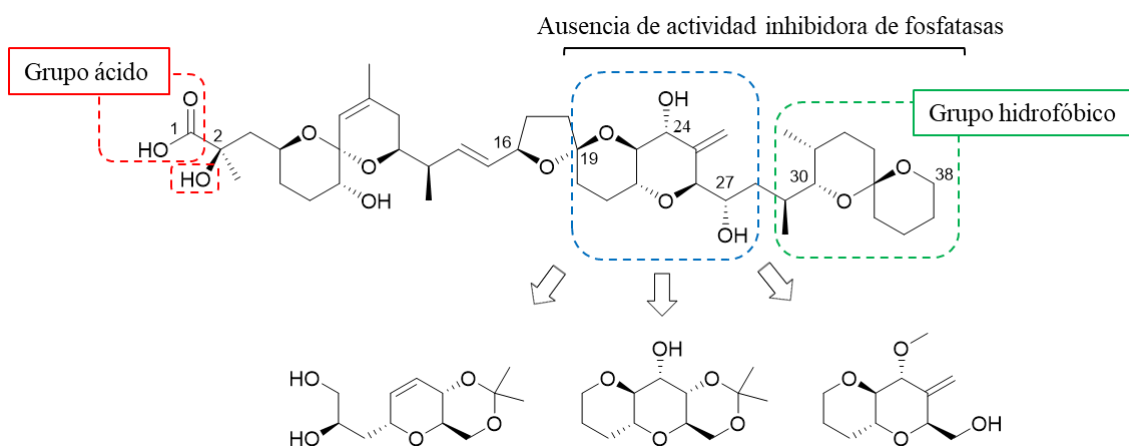


Figura 35. Diseño de los análogos de AO. En rojo, el farmacóforo común de inhibidores de fosfatasa (grupo ácido e hidroxilo en C2); en verde, grupo hidrofóbico responsable de la selectividad hacia PP2A; en azul, fragmento que aporta más afinidad por PP2A.

Para conseguir el compuesto final, se propusieron los siguientes cambios en la estructura del fragmento C19–C27 del AO:

- Configuración estereoquímica y sustitución en C19. Se eliminó la configuración *R* de C19 presente en AO. Esta simplificación está justificada por el descubrimiento en 2007 de un análogo de AO, 19-epi-AO, aislado del dinoflagelado marino *Prorocentrum Belizeanum*.²³³ La única diferencia entre AO y 19-epi-AO es la configuración absoluta en C19, siendo *R* en AO y *S* en 19-epi-AO. Los dos inhibidores tienen valores de CI_{50} similares para inhibir PP2A. Sin embargo, 19-epi-AO es aproximadamente 10 veces

menos potente frente a PP1 que AO y, por tanto, es un inhibidor de PP2A aún más selectivo que AO. No obstante, puesto que la afinidad hacia PP2A es parecida, con el fin de simplificar en lo posible la síntesis, se decidió eliminar la posible sustitución en esta posición.

- Metilación del alcohol en C24. Una de las interacciones inhibitoras entre AO y PP2A ocurre entre el hidroxilo de C24 y Arg214, respectivamente, mediante la generación de un enlace de hidrógeno.²³⁴ Para evitar la inhibición de la actividad fosfatasa, se propuso la metilación del OH, modificación que además mejoraría los parámetros fisicoquímicos, como se explicará más adelante. Otra alternativa elegible, fundamentada en el estudio de Kita y col., hubiera sido cambiar la configuración de C24 para afectar a la interacción con Arg214, ya que estos autores observaron que el análogo epímero de AO en esa posición (24-epi-AO) tiene una potencia inhibitora de PP2A 50 veces inferior a la de AO en células leucémicas L121017.²³⁵ En cualquier caso, se consideró que la metilación en C24 de AO sería suficiente para impedir la interacción inhibitoria sobre PP2A.
- Configuración OH en C27. En el diseño del compuesto final se ha eliminado la quiralidad de C27, manteniendo el hidroxilo. En derivados oxidados de AO, que presentan en C27 una cetona en vez de OH, se observa una disminución de la afinidad por PP1 de unas 40 veces con respecto a AO, y de 230 veces por PP2A.²³⁶ Así, la estructura del compuesto final diseñado tiene alto grado de libertad espacial. Ciertamente, el grupo hidroxilo de C27 parece estar presente en una posición relativamente exenta de formar enlaces intramoleculares, en comparación con los otros tres grupos hidroxilo presentes en AO.²³⁶

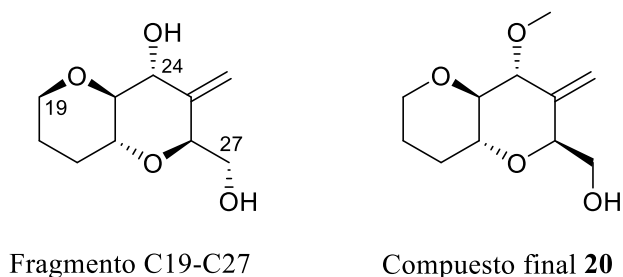


Figura 36. Estructura del fragmento C19–C27 y el compuesto final **20**.

A través de la ruta sintética planteada para llegar al compuesto final **20**, se accede a diversos compuestos intermedios con una estructura química que permite suponer que poseen cierta afinidad por el sitio hidrofóbico alostérico de PP2A. Por este motivo, y según se propone en los *Objetivos* de esta Tesis Doctoral, la evaluación farmacológica de estos productos intermedios también forma parte del plan de trabajo del presente estudio.

1.3. Conclusiones parciales

- Basados en la amplia literatura existente sobre SAR del AO con PPP, se propone esta toxina natural para la búsqueda de nuevas moléculas con capacidad moduladora de la actividad de PP2A.
- El fragmento C19–C27 de AO presenta afinidad por PP2Ac, determinada por estudios *in silico* e *in vitro*, pero no posee capacidad inhibidora sobre la actividad fosfatasa de la enzima.
- Ligeras modificaciones en la estructura química del fragmento C19–C27 de AO ofrecen la posibilidad de diseñar una familia de compuestos con potencial afinidad por PP2Ac impidiendo a los inhibidores endógenos de la enzima comprometer su actividad fosfatasa.

2. SÍNTESIS ORGÁNICA Y CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE ANÁLOGOS DE ÁCIDO OKADAICO

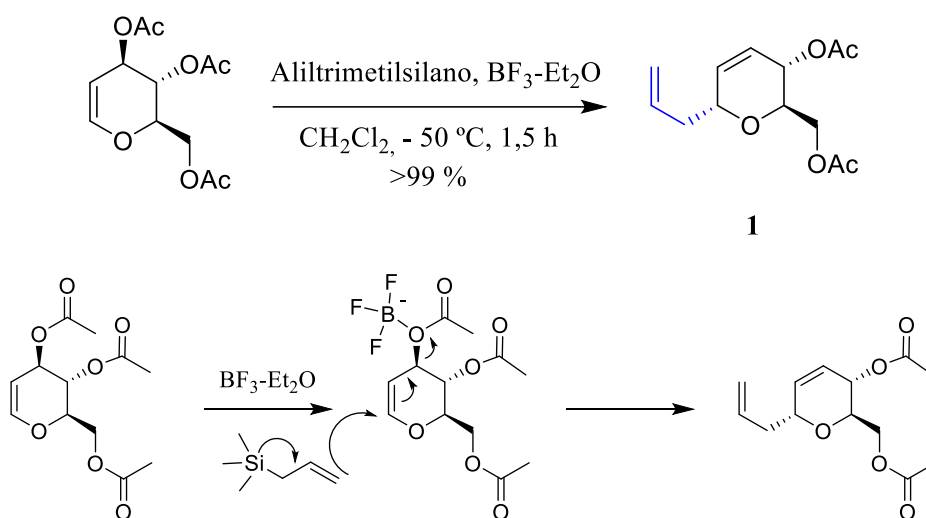
2.1. Reacciones químicas y caracterización estructural

Hasta la actualidad se han publicado tres síntesis totales del AO. En 1986, el grupo de Isobe describió la primera síntesis total, que publicó en tres partes según el fragmento obtenido: C1–C14,²³⁷ C15–C27¹⁹⁰ y C28–C38.²³⁸ En 1997, el grupo de Forsyth publicó otra síntesis total a partir del diseño de tres fragmentos altamente funcionalizados.²³⁹ Finalmente, en 1998 Ley y col. presentaron una tercera síntesis total del AO que, de manera retrosintética, también construyeron la molécula final a partir de 3 bloques.²⁴⁰

Nuestra propuesta de síntesis de análogos del fragmento C19–C27 de AO sigue, parcialmente, el procedimiento descrito por el grupo de Isobe¹⁹⁰ con algunas modificaciones para optimizar cada una de las reacciones propuestas hasta acceder al compuesto final **20**. A continuación, se describen las reacciones químicas seguidas para obtener dicho compuesto. En el apartado *Anexos*, se incluyen los espectros de RMN de ¹H y ¹³C de todos los derivados.

2.1.1. Reacción de Hosomi-Sakurai

La reacción de Hosomi-Sakurai es una sustitución electrófila bimolecular con transposición. El mecanismo de reacción comienza con la activación del alqueno adyacente al grupo acetiloxi, al que se une un ácido de Lewis fuerte, como el trifluoruro de boro etiléterato, que exacerba el carácter electrófilo del carbono en β, es decir, C5 en el sustrato triacetato de D-glucal (Esquema 2). Así, una especie organometálica nucleófila, como es el aliltrimetilsilano, es capaz de atacar C5 produciendo la migración del doble enlace endocíclico hacia C3, lo cual provoca una fácil salida de acetato (Esquema 1).



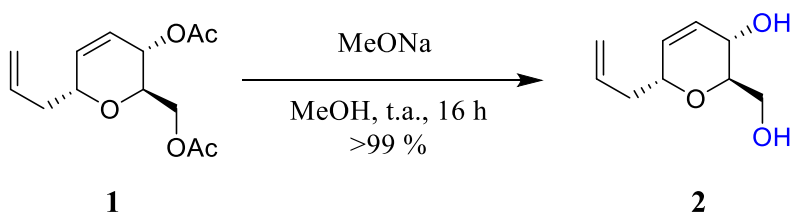
Esquema 1. Síntesis del compuesto **1**. Mecanismo de reacción para la reacción de Hosomi-Sakurai.

Al no transcurrir el mecanismo por intermedios carbocáticos, y tener el silano una cara de entrada en el pirano estéricamente favorecida, la quiralidad de C5 se puede controlar. Esta reacción enantioselectiva nos permitió obtener el compuesto **1** con rendimiento cuantitativo y ópticamente puro.

El compuesto **1** obtenido se caracteriza espectralmente por los dos grupos olefínicos, que aparecen, uno entre 5,60 y 5,50 ppm, y el otro entre 5,55 y 4,80 ppm, y por un sistema AB a campo alto que se corresponde con el nuevo metileno generado.

2.1.2. Hidrólisis de los acetilos

La obtención del diol **2** se llevó a cabo por hidrólisis de los acetatos presentes en **1**. El protocolo descrito por Ichikawa y col., basado en la adición de trietilamina en una mezcla agua:MeOH, no condujo al producto deseado, ni en tiempos largos. Alternativamente, el tratamiento con la base MeONa en MeOH rindió el compuesto **2** con rendimiento cuantitativo (Esquema 2).



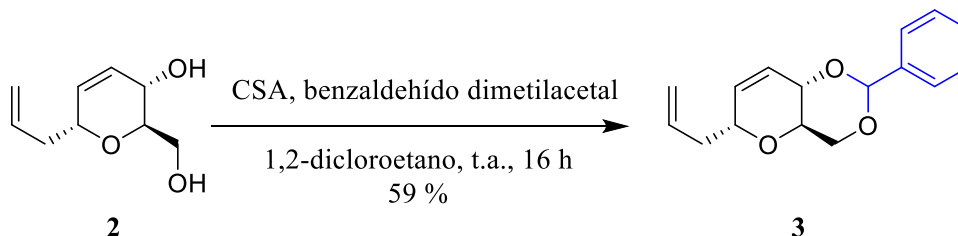
Esquema 2. Reacción de desprotección de los acetilos.

Los datos espectrales de RMN de ^1H pertenecientes al compuesto **2** confirman la obtención del producto deseado por desaparición de los singletes a 1,78 y 1,75 ppm, que representan a los metilos, así como por la aparición de un singlete ancho en torno a 3,82 perteneciente a los dos OH.

2.1.3. Protección del diol 2

En la síntesis total descrita en esta Memoria de Tesis desempeñan un papel fundamental las reacciones quimioselectivas de protección y desprotección. Las condiciones que debe cumplir un buen grupo protector son: 1) barato; 2) se debe poder instalar en el sistema polifuncional de manera quimioselectiva, fácil y eficientemente; 3) fácil de caracterizar y evitar complicaciones tales como la generación de nuevos centros estereogénicos; 4) estable en el mayor rango posible de técnicas de separación y purificación; 5) estable a las condiciones de reacción que va a sufrir el grupo funcional libre; 6) fácil de eliminar selectiva y eficientemente en condiciones altamente específicas y 7) que los subproductos de la desprotección sean fácilmente separados del producto.

La protección de los OH presentes en **2** nos ofrece la oportunidad de realizar reacciones oxidantes sobre los alquenos sin afectar a los grupos hidroxilo. La estrategia seleccionada por Isobe fue la transformación del diol en acetal por tratamiento con benzaldehído dimetilacetal y CSA (Esquema 3).



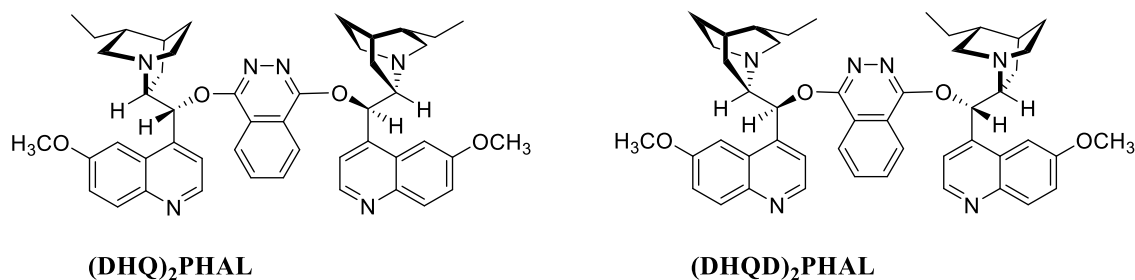
Esquema 3. Reacción de protección del diol **2** empleando benzaldehído dimetilacetal.

La recrystalización del crudo de reacción, como proponen los autores, reduce el rendimiento del producto puro considerablemente, por lo que se decidió alternativamente la purificación por cromatografía flash en columna de gel de sílice, obteniéndose así el compuesto **3**, que es caracterizado espectralmente por RMN de ^1H por la aparición del grupo aromático en 7,46–7,24 ppm, un singlete a 5,50 ppm asignado al CH acetálico, y la desaparición del singlete ancho correspondiente al diol libre. El compuesto **3** se utilizó como material de partida para sintetizar los compuestos **4**, **5** y **6**.

2.1.4. Dihidroxilación asimétrica de Sharpless. Obtención de **4** y **5**

La dihidroxilación asimétrica de Sharpless consiste en la adición *syn* enantioselectiva de alquenos para formar un diol vecinal con OsO_4 , en presencia de un auxiliar quiral derivado de quinina. La reacción necesita un entorno alcalino y la presencia de un reciclador del catalizador. Las condiciones de reacción se consiguen cómodamente con el reactivo comercial AD-mix, que está formado por $\text{K}_2\text{OsO}_2(\text{OH})_4$ (osmato potásico) como fuente de osmio, $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (ferricianuro potásico), utilizado como reoxidante del ciclo catalítico para reducir drásticamente las cantidades necesarias de osmio, K_2CO_3 para mantener el medio básico en la reacción y un ligando quiral (Esquema 4) que selecciona la quiralidad del producto:

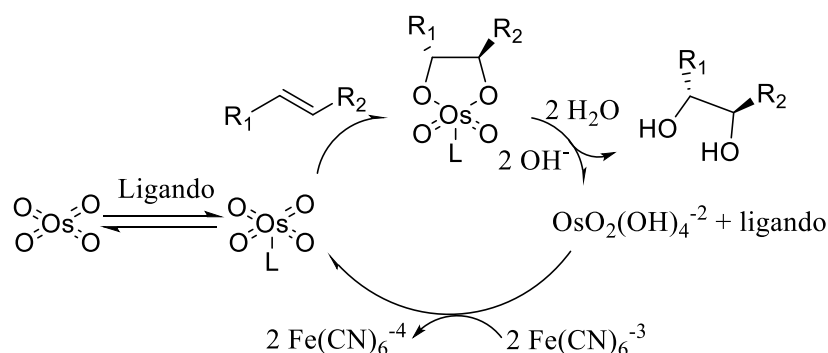
- AD-mix α : $(\text{DHQ})_2\text{PHAL}$
- AD-mix β : $(\text{DHQD})_2\text{PHAL}$



Esquema 4. Estructura química de los ligandos quirales (DHQ)₂PHAL y (DHQD)₂PHAL.

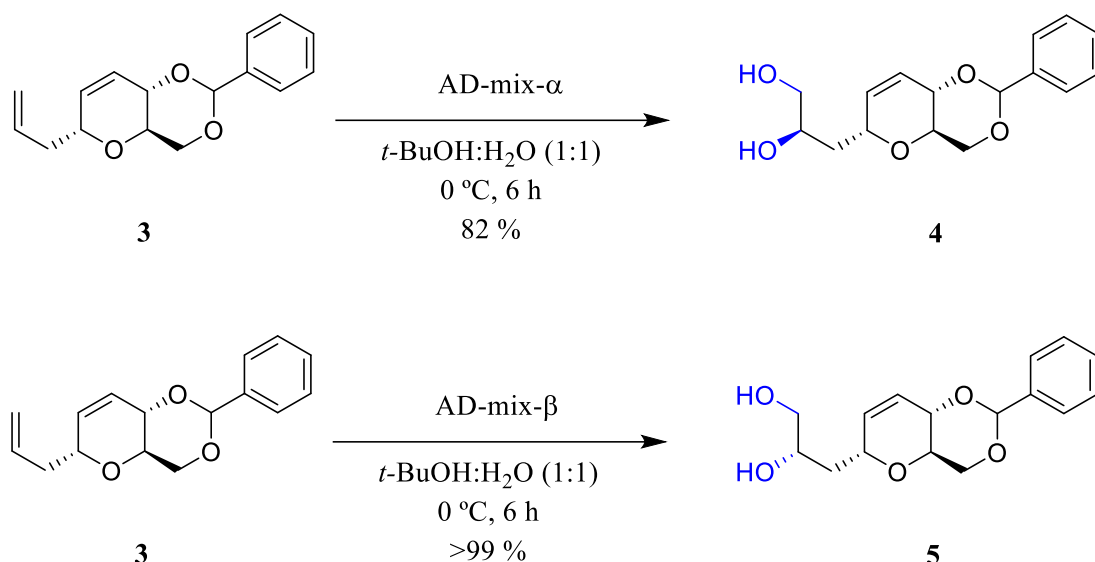
Cada uno de los dos reactivos, α y β , conducen a la adición por caras diferentes del alqueno. En nuestro caso, nos ofrece la oportunidad de obtener los dos epímeros en C2' por separado con pureza óptica.

El mecanismo de la dihidroxilación asimétrica de Sharpless comienza con una cicloadición [3+2] del complejo tetróxido de osmio-ligando con el alqueno. Esto conduce al intermedio cíclico, que posteriormente sufrirá una hidrólisis básica para liberar el diol deseado y el osmiato reducido. Finalmente, el oxidante presente en AD-mix en cantidades estequiométricas regenera el complejo tetróxido de osmio-ligando (Esquema 5).



Esquema 5. Mecanismo general para la reacción de dihidroxilación asimétrica de Sharpless con AD-mix.

Esta reacción se llevó a cabo utilizando como sustrato el compuesto **3** para obtener los compuestos **4** y **5** (Esquema 6), y con el compuesto **8** para obtener **9** y **10**, reacción que se comentará brevemente con posterioridad. Una vez completada la reacción, se realiza una adición bisulfítica. Después de agregar el AD-mix que contiene OsO_4 para producir la reacción, se debe reducir el OsO_4 restante manteniendo constante el pH de la solución. Además, la hidrólisis del osmiato se realiza mediante reacciones de sustitución simples. El NaHSO_3 , un agente reductor suave, facilita la sustitución del ligando al reducir aún más la especie de osmio. En todos los casos, los rendimientos de reacción son buenos (63–>99 %).



Esquema 6. Formación del compuesto **4** mediante el empleo de AD-mix- α (superior) y del compuesto **5** con AD-mix- β (inferior).

El estudio de los espectros de ¹H-RMN permite comprobar la obtención de los productos dada la desaparición de los protones correspondientes al alqueno terminal (a 5,86–5,63 y 5,05–4,95 ppm), mientras que se mantienen las señales correspondientes al alqueno endocíclico, comprendidas entre 6,01–5,63 ppm. Además, se observa la aparición de un singlete ancho correspondiente al diol. Las señales correspondientes a los hidrógenos de la cadena alifática también se ven consecuentemente alteradas. Por otro lado, el análisis del ¹³C-RMN parece indicar que el exceso enantiomérico es superior cuando se emplea el AD-mix α , presumiblemente porque el reactivo comercial es más enantioméricamente puro que el AD-mix β .

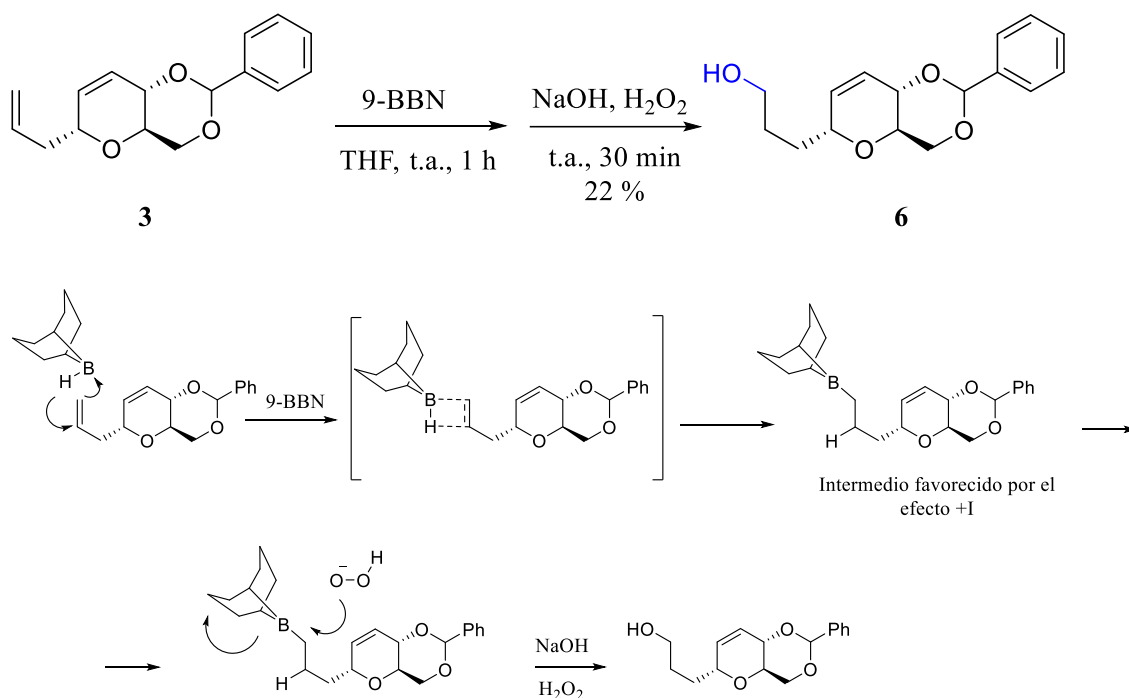
Como ya se ha mencionado anteriormente, este trabajo de Tesis Doctoral no pretendió únicamente el estudio farmacológico de un compuesto final con potencialidad para ser un nuevo activador de PP2A. Se consideró también de interés la evaluación farmacológica de los intermedios de la ruta sintética diseñada. Así, dentro de una estrategia de síntesis orientada a la diversidad, nos preguntamos cómo afectaría a la actividad farmacológica una modificación de la funcionalidad presente en los compuestos obtenidos. Es por ello por lo que se sintetizaron los compuestos **4** y **5**. No obstante, para la obtención del compuesto final, la ruta se diseñó con un solo hidroxilo en C1'. La síntesis de este compuesto, el **6**, se realizó mediante una reacción de hidroboración-oxidación a partir del compuesto **3**, tal como se describe a continuación.

2.1.5. Hidroboración-oxidación de **3**

La hidroboración-oxidación de olefinas es una reacción clásica para convertir alquenos en alcoholes. Sigue una regioquímica denominada anti-Markovnikov, debido a la electrofilia del

átomo de boro. El mecanismo comienza con la adición de borohidruro sobre el alqueno π -excedente de forma concertada y por ello con estereoquímica *syn*, uniéndose el boro al carbono menos sustituido. De esa manera, la carga parcial positiva es soportada de forma más estable por el carbono más sustituido, por efecto inductivo +I (Esquema 7). El siguiente paso de oxidación se efectúa con H_2O_2 en medio básico. El primer ataque nucleófilo de H_2O_2 sobre el átomo de boro provoca que todo el resto alquílico migre desde el boro hacia el oxígeno adyacente. El resultado final es un alcóxido de boro que, en medio básico acuoso, se degrada para liberar borato y el alcohol primario, el cual es el producto deseado.

La reacción descrita para la síntesis de **6** con BH_3 (presente de forma natural como diborano, B_2H_6) no mostró los resultados esperados, a pesar de intentarlo por varios métodos, como por ejemplo con la preparación *in situ* del diborano reactante. Por ese motivo, se decidió probar con otra especie de organoborano ampliamente utilizada, el 9-BBN. El 9-BBN es más sensible a las diferencias estéricas sutiles que otros boranos como el BH_3 , porque el sustituyente heterocíclico rígido impide la rotación interna para aliviar el impedimento estérico en el estado de transición, lo que permite actuar sobre el alqueno terminal sin que el alqueno endocíclico se vea afectado. La reacción es, por tanto, regioselectiva y estereoespecífica (Esquema 7). Una característica muy interesante de este proceso es que no requiere ninguna activación por un catalizador. El THF suele ser el disolvente empleado en este tipo de reacciones. En cualquier caso, se obtuvo **6** con rendimientos bajos debido a problemas en el proceso de purificación cromatográfica.

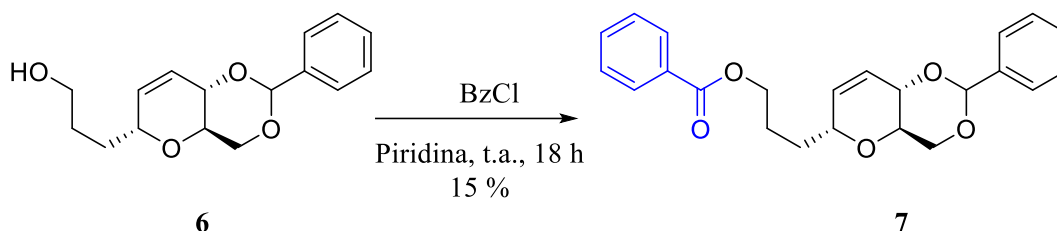


Esquema 7. Reacción y mecanismo de hidroboración-oxidación para la obtención del compuesto **6**.

La cromatografía automatizada durante la purificación de **6** fue insatisfactoria. El empleo de desactivantes de gel de sílice, como Et₃N o NH₄Cl, no evitó la descomposición del producto; lo mismo sucedió al utilizar una fase estacionaria básica como la alúmina. El único método aprovechable, posiblemente porque el compuesto está menos tiempo en contacto con la sílica, resultó ser la purificación en TLC preparativa, aunque con bajo rendimiento. Sin embargo, esta última técnica presenta como principal inconveniente la baja cantidad de producto que se puede purificar. Así, la ruta sintética completa se ve afectada en el rendimiento global. Esta fue una de las numerosas razones que nos obligó, posteriormente, a cambiar el grupo protector del diol **2** por otro tipo de acetal, lo cual se discutirá más adelante.

2.1.6. Benzoilación de **6**

Siguiendo la ruta sintética que conduce a la preparación de **20**, se realizó la protección del alcohol primario libre presente en **6** empleando BzCl y piridina, de acuerdo al método descrito por Ma y col.,¹⁹⁷ con pequeñas modificaciones (Esquema 8). Conscientes de la posible sensibilidad que podrían presentar los productos a la acidez, se emplearon disolventes neutralizados para su extracción. Tras la purificación, se obtuvo **7** con rendimiento muy bajo (15 %).



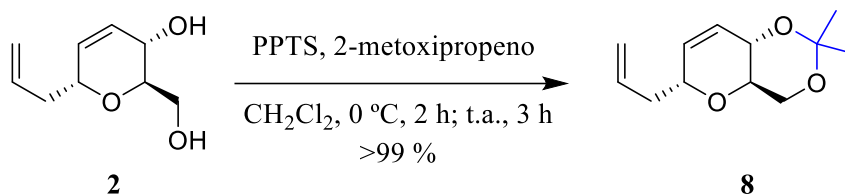
Esquema 8. Benzoilación para obtener el compuesto **7**.

El compuesto **7** se caracteriza espectralmente en RMN de ¹H por la desaparición del singlete asignado al OH y un aumento de las señales aromáticas, así como por un cambio significativo en la señal correspondiente a los ¹H de C1', que se desplaza a campo más bajo 0,4 ppm. En RMN de ¹³C, se aprecia la aparición de una señal en torno a 167 ppm, correspondiente al carbonilo del nuevo éster generado.

A partir del compuesto **7**, el protocolo seguiría con la desprotección selectiva del acetal para obtener **13**. No obstante, el fenilenacetilal, que se incorporó en la ruta de síntesis desde el compuesto **3**, resultó ser un grupo protector de difícil manejo ya que algunas reacciones donde estuvo presente evidenciaron problemas en la síntesis, el aislamiento o la purificación. Así pues, se decidió cambiar de grupo protector para los dos OH presentes en **2**.

2.1.7. Protección alternativa del diol 2

Se eligió dimetilacetal para llevar a cabo la protección del compuesto **2**, siguiendo el protocolo descrito por Nicolau y col..¹⁹⁶ El mecanismo de reacción transcurre de manera análoga al de la reacción descrita en el apartado 2.1.3. *Protección del diol 2*. En este caso, el entorno ácido lo proporciona el *p*-toluensulfonato de piridinio (PPTS) que facilita que 2-metoxipropeno, el éter de enol derivado de acetona, sufra la doble adición nucleófila del diol, rindiendo el producto **8** de forma cuantitativa y sin necesidad de purificación (Esquema 9).

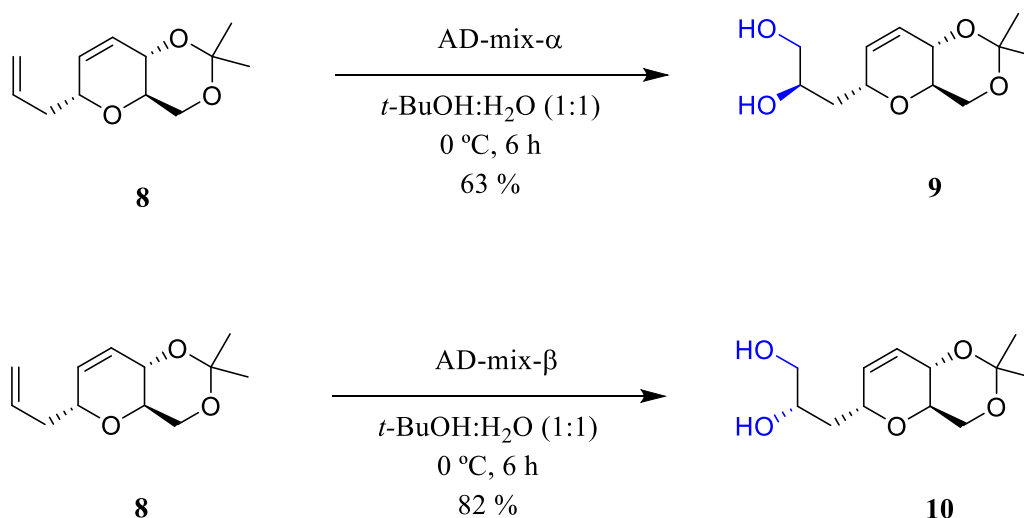


Esquema 9. Reacción de protección del diol **2** empleando 2-metoxipropeno.

La identificación del compuesto por RMN de ¹H resulta muy sencilla por la aparición de dos singletes a 1,41 y 1,32 ppm, correspondientes a los metilos del dimetilacetal. Asimismo, también se observa la desaparición del singlete ancho del diol.

2.1.8. Dihidroxilación asimétrica de Sharpless. Obtención de 9 y 10

Se prepararon los derivados dihidroxilados a partir del compuesto **8** con las condiciones de dihidroxilación asimétrica anteriormente comentadas, con el fin de estudiar farmacológicamente el efecto de la presencia del diol vecinal sobre este análogo. Así, según el reactivo AD-mix utilizado, se pudo obtener los derivados **9** y **10**, epímeros entre sí en C2', con buen rendimiento, alta enantioselectividad y sin necesidad de purificación cromatográfica (Esquema 10).

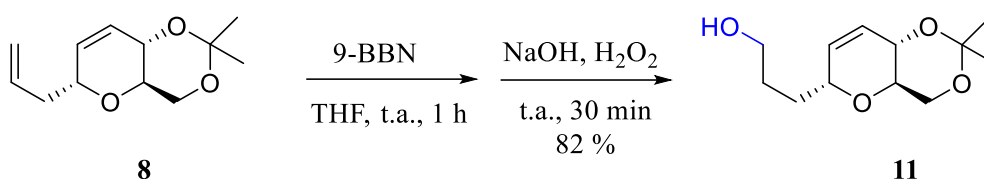


Esquema 10. Formación del compuesto **9** mediante el empleo de AD-mix- α (superior) y del compuesto **10** con AD-mix- β (inferior).

Similarmente a lo observado para **4** y **5**, el análisis de los espectros de ^1H -RMN de los productos obtenidos confirma la transformación deseada, ya que desaparecen los protones del alqueno terminal a 5,05–4,95, aparece un singlete ancho en torno a 3 ppm debido a los dos nuevos OH y se produce una modificación de la apariencia de las señales alifáticas.

2.1.9. Hidroboración-oxidación de **8**

El compuesto **8** se sometió a una reacción de hidroboración-oxidación en las condiciones puestas a punto previamente para el proceso de síntesis del compuesto **3** (Esquema 11). Sin embargo, a diferencia de este último proceso, la formación del derivado **8** mostró un buen rendimiento, lo que reforzó la elección del dimetilacetal como protector.

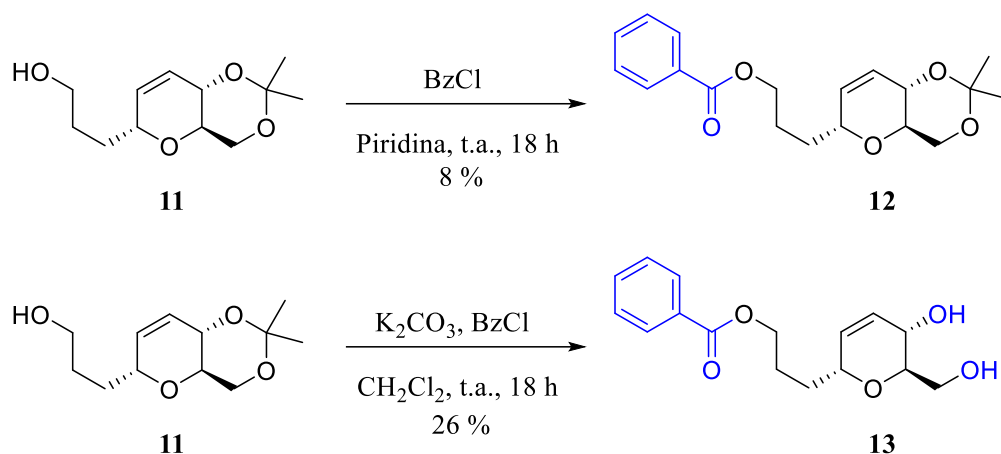


Esquema 11. Reacción de hidroboración-oxidación para la obtención del compuesto **11**.

En RMN de ^1H , la formación de **11** se aprecia claramente por la desaparición de la señal olefínica correspondiente al alqueno terminal (5,05–4,95 ppm), sin alterarse las señales referentes al alqueno endocíclico (5,80–5,65). Además, es notable el cambio en la forma y multiplicidad de la señal correspondiente al CH_2 ($\text{C}2'$), ahora unido a CH_2OH , que aparece más apantallada y forma un multiplete junto con el CH_2 unido al ciclo ($\text{C}3'$).

2.1.10. Benzoilación del alcohol **11**

La protección con benzoilo del alcohol primario sobre $\text{C}1'$ presente en **11**, en las mismas condiciones descritas para **6**, condujo a la formación de **12** en muy bajo rendimiento (8 %). Con el fin de aumentarlo, se sustituyó la base empleada inicialmente (piridina) por K_2CO_3 . El crudo resultante se purificó por cromatografía flash robotizada en columna de sílica. No obstante, en lugar de obtener el producto deseado, se obtuvo, con bajo rendimiento (26 %), el compuesto **13**, que no solo presentaba benzoilación sobre $\text{C}1'$, sino que además había perdido el grupo dimetilacetal (Esquema 12).

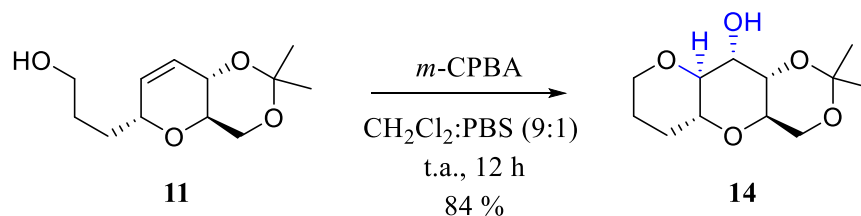


Esquema 12. Benzoilación del compuesto **11** en diferentes condiciones.

Siendo necesaria la doble protección diferencial (Bz y diacetal) para futuras reacciones, y al ser imposible aumentar el rendimiento de **12**, se tomó la decisión de cambiar la ruta sintética para conseguir la estructura bicíclica característica del fragmento C19–C27 de AO, partiendo del compuesto **11**.

2.1.11. Epoxidación y ciclación de **11**

Siguiendo el protocolo descrito por Shoji y col.,¹⁹⁸ se obtuvo el compuesto deseado mediante formación de un epóxido sobre el alqueno de **11** y posterior apertura del oxirano por ataque nucleófilo del OH libre, consiguiendo la ciclación (Esquema 13).

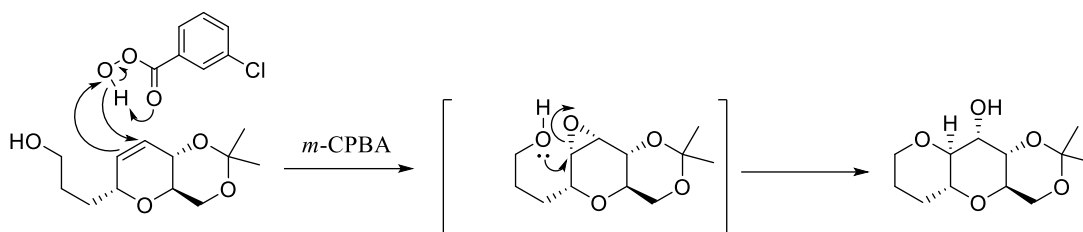


Esquema 13. Reacción de epoxidación y posterior ataque nucleofílico para la obtención del compuesto **14**.

La formación del epóxido se realizó con $m\text{-CPBA}$. El mecanismo de epoxidación de alquenos es concertado. A través de un mecanismo denominado de “mariposa”, los perácidos, como el $m\text{-CPBA}$, tienen la capacidad de introducir un átomo de oxígeno con carácter electrófilo que puede agregarse a alquenos excedentes en carga electrónica. Después de la formación del epóxido, tiene lugar un ataque intramolecular del OH libre sobre C7, lo que genera una cicloeterificación en condiciones ácidas controladas (cabe señalar que, al inicio de la reacción, junto con el CH_2Cl_2 , se incorpora un tampón fosfato a pH 7, puesto que el $m\text{-CPBA}$ da como producto de reacción ácido benzoico, soluble en agua). De los dos posibles ataques, predomina la

formación del ciclo tetrahidropiránico de 6 miembros, con alta diastereoselectividad y buen rendimiento (Esquema 14). En reacciones similares descritas en la literatura, después del *m*-CPBA se debe añadir CSA para completar la reacción. Sin embargo, en nuestro caso no fue necesario, e incluso su uso provocó la descomposición del producto. La etapa de neutralización de la reacción presentó ciertas particularidades. El *m*-CPBA no es soluble en agua, pero sí en el disolvente de la reacción, CH₂Cl₂, lo que dificultó su eliminación de la fase orgánica. Esto último se consiguió realizando la neutralización con disolución saturada de Na₂SO₃.

En la ruta sintética descrita por Ichikawa y col.¹⁹⁰ se describe una epoxidación parecida del alqueno endocíclico, pero se impide el ataque intramolecular del alcohol primario mediante protección previa de este, ya que los autores siguen una ruta distinta.



Esquema 14. Mecanismo de formación del epóxido y ataque intramolecular del alcohol para la obtención del compuesto **14**.

En la imagen generada por modelización molecular con el programa Spartan (Imagen 3), se demuestra el alto grado de diastereoselectividad de la reacción, donde el epóxido se forma hacia atrás, consiguiendo la obtención de un solo producto enantioméricamente puro, lo cual reproduce lo obtenido por otros autores con entidades químicas muy similares.²⁴¹

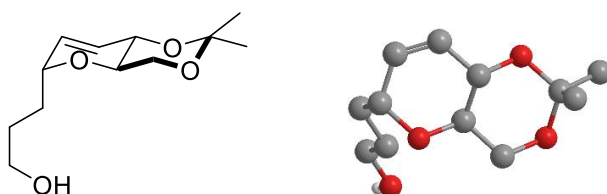
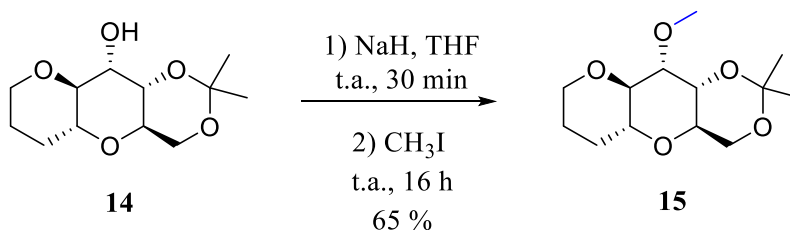


Imagen 3. Estructura en silla y tridimensional del compuesto **11**.

Esta reacción transcurre con buenos rendimientos (84 %). En el espectro de ¹H-RMN se observa la desaparición de las señales correspondientes al alqueno a 5,83 y 5,65 ppm. También cambian notablemente las señales atribuibles a los protones vecinales del alqueno. En ¹³C-RMN se observa una presencia testimonial del diastereómero minoritario, no siendo posible el cálculo del exceso diastereomérico de la reacción debido a la falta de proporcionalidad de las señales de RMN de ¹³C.

2.1.12. Metilación del alcohol **14**

Como se ha comentado en el apartado 1.2. *Diseño de análogos de ácido okadaico carentes de potencial inhibidor*, la metilación del alcohol **14** se propuso para mejorar las interacciones con el bolsillo hidrofóbico de PP2Ac, pero también para aumentar la lipofilia del compuesto final. Desde el punto de vista sintético, la metilación en este momento de la cadena de síntesis actúa como protección de grupo funcional al permitir, con posterioridad, eliminar el acetal y someter a diferentes reacciones a los dos alcoholes generados, sin que este se vea afectado. Ciertamente, en primer lugar, se planteó proteger el alcohol en C10 con cloruro de 2-metoxietoximetilo (MEMCl) en medio básico y THF o CH₂Cl₂ como disolvente. Sin embargo, esta reacción cursó con bajo rendimiento y su posterior desprotección exigiría condiciones drásticas de acidez (HCl 6 N), por lo que se descartó esta estrategia. Finalmente, la formación del grupo metoxi se consiguió por reacción del alcohol **14** con una base (NaH) y el agente metilante CH₃I (Esquema 15). Esta reacción cursó con un rendimiento del 65 %, dando lugar al compuesto **15**.



Esquema 15. Metilación del alcohol **14**.

El grupo metoxi necesitaría condiciones agresivas para ser eliminado, por lo que podemos realizar un amplio abanico de transformaciones químicas sobre los dos alcoholes que están protegidos como acetal. En cualquier caso, el derivado metoxilado **15** nos pareció de interés desde el punto de vista farmacológico, como se ha comentado anteriormente. Además, presenta óptimos parámetros fisicoquímicos, por lo que su desprotección posterior no ha sido prevista en esta Tesis.

2.1.13. Hidrólisis del acetal **15**

Los acetónidos se hidrolizan fácilmente en medios ácidos próticos acuosos, existiendo varias alternativas en la literatura para llevar a cabo este proceso: a) ácido acético-agua, b) ácido trifluoroacético-agua, c) HCl-THF o d) resina intercambiadora Dowex, entre otros. Para realizar la hidrólisis del acetónido del compuesto **15**, se propusieron diversos métodos. En primer lugar, se propuso la hidrólisis con CSA, según el método descrito por Smith y col.,²⁴² pero no se obtuvo el producto deseado. En segundo lugar, se intentó la ruptura del acetal con *p*-TsOH y MeOH,²⁴³ con el mismo resultado infructuoso. La reacción con TFA también fue insatisfactoria.²⁴⁴ Posteriormente, se intentó la hidrólisis por generación de HCl *in situ* con cloruro de acetilo y MeOH. Este protocolo pareció resultar óptimo por los resultados observados en ¹H-RMN, ¹³C-

RMN y EMAR. El análisis químico elemental con la identidad deseada se ajustaba a la fórmula empírica teórica incorporando una molécula de HCl, lo que nos hizo pensar que se había formado el clorhidrato. Para confirmar esta hipótesis, se realizó un estudio de difracción de rayos X.

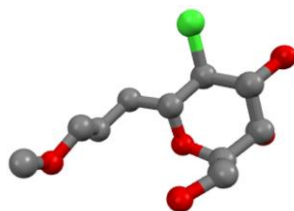
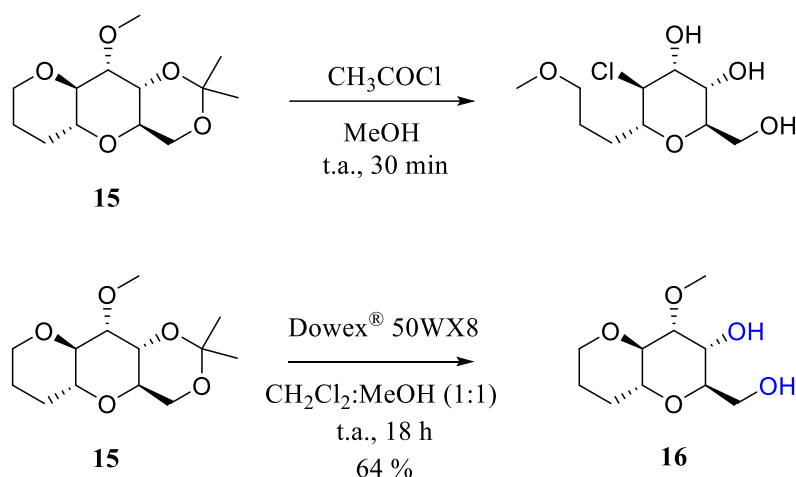


Figura 37. Estructura tridimensional obtenida por rayos X del compuesto resultante de la hidrólisis de **15** con HCl generado *in situ*.

Como se aprecia en la Figura 37, la estructura obtenida no coincidió con la esperada, sino a una especie formada por el ataque nucleófilo de cloruro sobre la posición C9a, junto con metilación del OH primario libre formado en la cadena alifática. Esta evolución adversa de la reacción nos hizo plantear otra alternativa para eliminar el acetal. Sin embargo, la configuración de la estructura *2R,3S,4R,5S,6R* nos permite confirmar que las estructuras anteriores poseen la quiralidad deseada. Finalmente, se optó por llevar a cabo la hidrólisis del acetal con la resina de intercambio catiónico Dowex® 50WX8 (H⁺). Este intercambiador posee en su estructura cargas negativas neutralizadas con H⁺ que protonan suavemente los átomos de oxígeno. El MeOH presente en el medio ataca de forma nucleófila al carbono acetálico, liberando así el diol **16** con un rendimiento medio (64 %) (Esquema 16). Esta resina también fue empleada por Ichikawa y col. para realizar la hidrólisis de un grupo bencilideno.¹⁹⁰

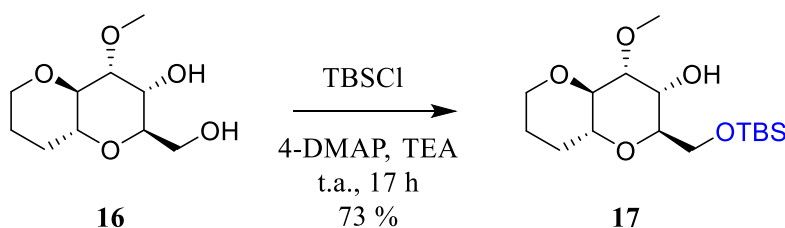


Esquema 16. Hidrólisis del acetal **15** en diferentes condiciones.

La obtención del compuesto **16** es inequívoca por la desaparición en el espectro de ^1H -RMN de las señales atribuidas a los metilos correspondientes del acetal, a 1,50 y 1,43 ppm, análogamente a como se aprecia en las señales esperables para carbonos primarios en ^{13}C -RMN.

2.1.14. Protección parcial del diol **16** con TBSCl

De los dos alcoholes libres presentes en el 1,3-diol **16**, uno es primario y, por tanto, está menos impedido estéricamente. Hemos aprovechado esta circunstancia para promover su protección selectiva como sililéter frente al OH secundario, con haluros de sililo que muestran restos voluminosos. De los posibles candidatos a utilizar, como el cloruro de trimetilsililo (TMS), el cloruro de *t*-butildifenilsililo (TBDPS) o el cloruro de *t*-butildimetilsililo (TBS), se prefirió el TBSCl por ser ideal para proteger alcoholes poco impedidos estéricamente, ser estable en cromatografía, resistir las condiciones de las reacciones posteriores y por su sencilla caracterización por RMN. Esta protección transcurre en medio básico, a través de una reacción de tipo $\text{S}_{\text{N}}2$ en la que el electrófilo está tan impedido que solo permite la reacción con alcoholes primarios (Esquema 17).



Esquema 17. Reacción de protección selectiva del alcohol para obtener el compuesto **17**.

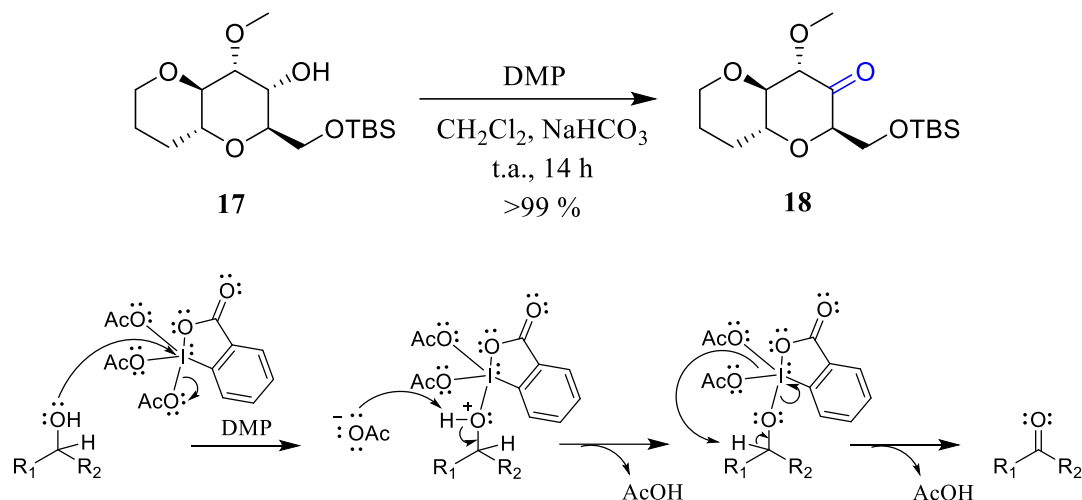
La protección selectiva del alcohol primario sobre C1' permitió llevar a cabo las transformaciones químicas necesarias sobre el OH que queda libre en **17** para la obtención de **20**.

2.1.15. Reacción de Dess-Martin

El compuesto **18** se obtuvo mediante reacción de oxidación de Dess-Martin (Esquema 18). El peryodinano de Dess-Martin (DMP) es un compuesto con un yodo de alto estado de oxidación, +5, que produce una oxidación suave y selectiva de alcoholes a los aldehídos o cetonas correspondientes. El DMP tiene varias ventajas sobre los oxidantes de cromo o la oxidación de Swern, ya que permite trabajar en condiciones más suaves (t.a., pH neutro), presenta menor tiempo de reacción y rendimientos más altos. Adicionalmente, DMP presenta tolerancia de grupos funcionales sensibles y posee una larga vida útil, siempre que se almacene a baja temperatura.

La reacción comienza con una sustitución en el yodo, donde el grupo alcohol del sustrato reemplaza un resto acetato, liberando ácido acético. Seguidamente, otro grupo acetato es capaz

de arrancar el hidrógeno en posición α , formándose el carbonilo que se abstrae del complejo de arilyodo (III) (Esquema 18).

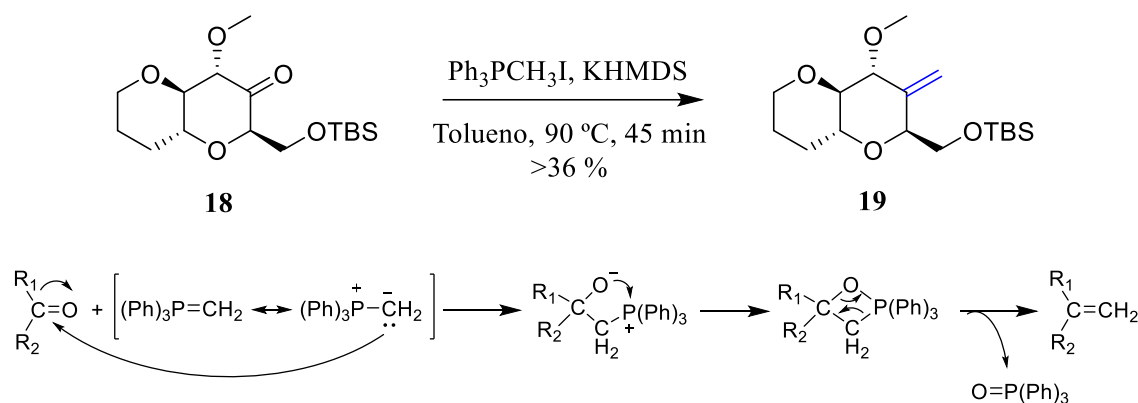


Esquema 18. Reacción y mecanismo de oxidación de Dess-Martin para obtener el compuesto **18**.

La oxidación se lleva a cabo en CH_2Cl_2 a t.a.. Para compuestos que son sensibles a la ligera acidez de los dos equivalentes de ácido acético producidos por la reacción, como es nuestro caso, se puede usar NaHCO_3 añadido en exceso al principio de la reacción para controlar el pH. El producto es aislado finalmente mediante lavado sucesivo con soluciones saturadas de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ y NaHCO_3 , sin necesidad de purificación adicional y con rendimiento cuantitativo. Aunque los espectros de ^1H -RMN son muy similares, se corrobora la formación de la cetona por la aparición de una señal en ^{13}C -RMN en torno a 204 ppm y la desaparición de señal alifática, así como la reducción de la multiplicidad de los ^1H en α al carbonilo. El ^{13}C -RMN demuestra la presencia de los dos diastereómeros posibles.

2.1.16. Reacción de Wittig

La obtención del compuesto **19** se llevó a cabo mediante la reacción de Wittig (Esquema 19). Se trata de una reacción relativamente compleja pero extraordinariamente útil porque permite transformar aldehídos y cetonas en alquenos mediante el empleo de iluros de fósforo. El mecanismo de la reacción de Wittig se puede dividir en varias etapas (Esquema 19). Primero, ocurre un ataque nucleofílico del iluro de fósforo al grupo carbonilo. Como resultado se forma una betaína fosforilada que se cicla para obtener un ciclo de oxafosfaciclobutano, el cual evoluciona para liberar el alqueno deseado y óxido de trifenilfosfina como subproducto.

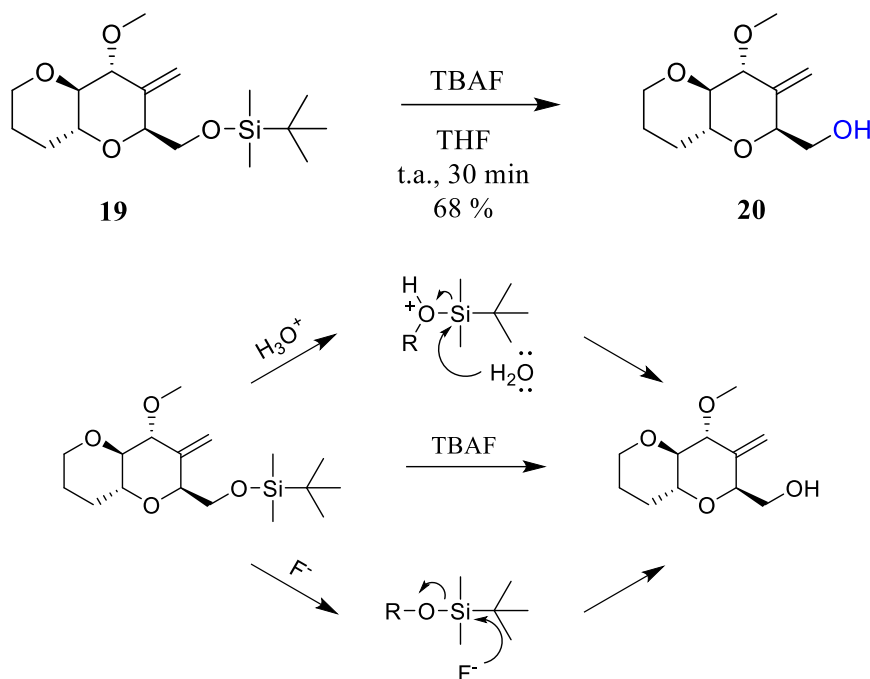


Esquema 19. Obtención del compuesto **19** mediante reacción de Wittig (superior) y mecanismo de la reacción de Wittig (inferior).

La especie reactante iluro de fosforo se formó por desprotonación de $\text{Ph}_3\text{PCH}_3\text{I}$ con KHMDS en las condiciones descritas en *Materiales y métodos*, sobre lo que se añadió el sustrato, provisto de un grupo carbonilo. En estas condiciones, se obtuvo el compuesto **19** con rendimiento bajo (36 %). La formación del alqueno exocíclico se confirmó por la aparición de una señal inequívoca en ^1H -RMN en torno a 5,3 ppm, y en ^{13}C -RMN a 139 ppm.

2.1.17. Preparación del análogo al fragmento C19–C27 de AO: desprotección final

La eliminación del grupo sililo tuvo lugar en el último paso de la ruta sintética, obteniéndose el compuesto final **20** (Esquema 20). Los sililéteres se pueden eliminar del sustrato protegido mediante reacción con sales de fluoruro (Esquema 20). Esta desprotección se basa en la fortaleza del enlace Si–F. Así, cuando se llega al estado de transición concertado de la sustitución nucleófila bimolecular, el anión fluoruro fuerza la ruptura del enlace O–Si. Dado que hemos usado el agente TBAF, el correspondiente alcóxido que se libera tiene como contraión tetrabutilamonio. Al interrumpir la reacción por adición de NH_4Cl saturado se regenera el alcohol en C1', obteniéndose el producto **20** tras purificación cromatográfica con un rendimiento del 68 %. Está descrito que la velocidad de la reacción es inversamente proporcional al tamaño del silileter. Así, los restos trimetilsililo se eliminan fácilmente, mientras que los *t*-butildimetilsilileteres son más resistentes.



Esquema 20. Reacción y mecanismo de desprotección del TBS para obtener el compuesto **20**.

En el espectro de ^1H -RMN de **20**, se observa la desaparición de las señales correspondientes al grupo TBS, es decir, de los singletes a 0,89 y a 0,06 ppm, análogamente a como se aprecia en las señales esperables para carbonos primarios en ^{13}C -RMN. Además, en el espectro de ^1H -RMN aparece la señal correspondiente al nuevo OH como un singlete ancho, en torno a 2,61 ppm.

2.2. Discusión general

Está ampliamente aceptado que las moléculas candidatas a convertirse en fármacos han de ser estructuras sencillas, con un diseño de síntesis asequible en pocos pasos de reacción, con ausencia de centros quirales y obtención con altos rendimientos. La síntesis del compuesto final descrito en esta Tesis, lejos de ser un procedimiento sencillo, ha presentado muchas complicaciones durante su desarrollo. No obstante, la constante búsqueda de nuevos protocolos y la optimización de las reacciones descritas ha permitido hacer asequible la ruta sintética propuesta.

El mesilato de eribulina (Halaven TM), aprobado en 2010 como agente anticancerígeno, representa un análogo simplificado del producto natural marino halicondrina B aislado en 1986 de la esponja marina *Halichondria okadai*. La historia del descubrimiento, desarrollo y lanzamiento de este fármaco demuestra de manera impactante hasta qué punto los límites de la síntesis total de productos naturales se han superado hoy en día a escala industrial, de forma que

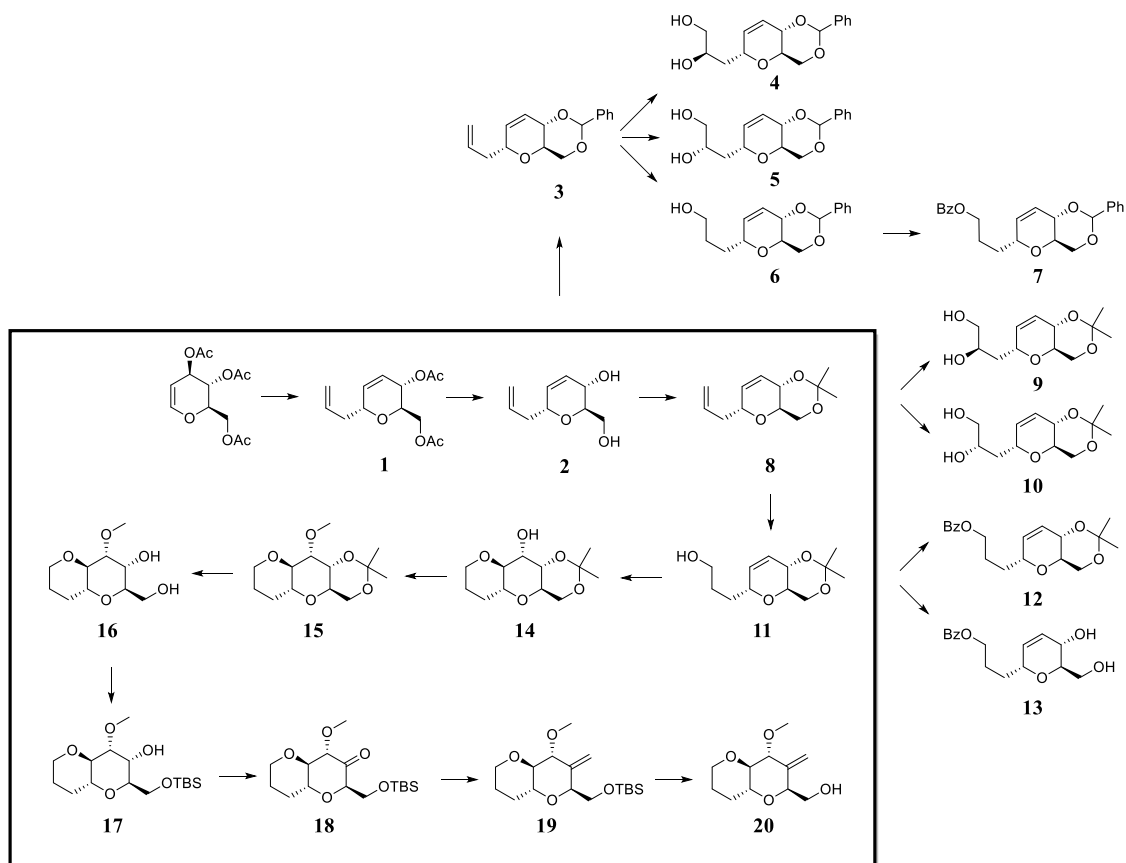
el mesilato de eribulina puede considerarse en la actualidad el fármaco de síntesis con la preparación más compleja.²⁴⁵

Es interesante resaltar que, actualmente, la complejidad estructural de las moléculas sintéticas se ha visto incrementada en aras de conseguir mayor protección comercial de los posibles fármacos patentables. Consecuentemente, la media del número de pasos sintéticos por molécula patentable se ha incrementado a más de 8. Aunque la mayor parte de las rutas sintéticas iniciales son lineales, como en nuestro caso (Esquema 21), es posible que el proceso de escalado establezca la necesidad de desarrollar rutas convergentes o más cortas. En el caso de que alguna de las moléculas sintetizadas fuera candidata de estudio en fase más avanzada, es importante tener en cuenta que la síntesis a gran escala requiere optimización para reducir el número de pasos y mejorar el rendimiento global. En ocasiones, es necesario diseñar una ruta nueva a gran escala, no solo para aumentar el rendimiento, sino también para reemplazar reactivos y disolventes peligrosos, así como para evitar la formación de productos secundarios indeseados y desarrollar procedimientos eficaces de aislamiento y purificación. Así, la mayoría de las síntesis llevadas a cabo en las etapas tempranas del proceso de descubrimiento de nuevos fármacos se ven modificadas en el proceso posterior de escalado. En lo que respecta al presente trabajo de Tesis, las optimizaciones incorporadas a las diferentes reacciones encaminadas a la obtención del compuesto final **20** han proporcionado buenos rendimientos en el proceso de obtención de diversos análogos de AO (Tabla 2). Además, en muchas de estas reacciones de síntesis, no ha sido necesario recurrir a las cromatografías, las cuales son métodos de purificación a evitar en el escalado de la producción industrial de un fármaco. El rendimiento global de la síntesis total para obtener el compuesto final **20** fue del 5 %.

Tabla 2. Rendimientos de las diferentes reacciones sintéticas descritas en esta Memoria de Tesis. En negrita, aquellas que forman parte de la síntesis lineal que da lugar al compuesto final **20**. Rendimiento total (RDTO TOTAL) para la obtención del compuesto **20** desde el triacetato de D-glucal.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Rdto	>99 %	>99 %	59 %	82 %	>99 %	22 %	15 %	>99 %	63 %	82 %
	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Rdto	82 %	8 %	26 %	84 %	65 %	64 %	73 %	>99 %	36 %	68 %

RDTO TOTAL = 5 %



Esquema 21. Esquema de la ruta sintética seguida en esta Memoria de Tesis.

En cuanto a la mezcla de diastereómeros en algunas reacciones, el problema se ha solventado con la realización de sucesivas purificaciones cromatográficas, puesto que el compuesto final **20** parece enantioméricamente puro por ^1H -RMN y ^{13}C -RMN.

2.3. Conclusiones parciales

- Partiendo de un sustrato comercial, se sintetizaron un total de 20 compuestos en condiciones suaves y con buenos rendimientos en la mayoría de los casos.
- La obtención del compuesto final **20** se consiguió en 11 pasos de reacción.
- La protección del compuesto **2** con dimetilacetal resulta más favorable que la realizada con fenilenacetal para la ruta de síntesis en cadena que se propone en esta Tesis.
- La presencia de varias funcionalidades químicas similares en muchos de los intermedios de la ruta de síntesis hace que la protección selectiva haya sido clave para alcanzar la molécula objetivo final.

- De la misma manera, la realización de diversas reacciones de alto carácter regioselectivo, como la hidroboración-oxidación y la hidroxilación asimétrica de Sharpless, ha facilitado el acceso a los productos deseados.

3. PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS *IN SILICO*

3.1. Introducción

Los análogos de AO descritos en esta Memoria de Tesis han sido diseñados con el objetivo de actuar en el SNC. Por ello, fue imprescindible evaluar si estos compuestos podían atravesar la barrera hematoencefálica (BHE). A pesar del gran esfuerzo que la I+D de fármacos ha realizado en los últimos años en la búsqueda de nuevas moléculas dirigidas a la EA, una gran mayoría de los compuestos obtenidos, moléculas pequeñas o agentes biológicos, no consiguen penetrar la BHE en grado suficiente como para inducir efectos farmacológicamente significativos a nivel central.²⁴⁶ Por este motivo, la incapacidad para atravesar la BHE se considera un criterio de exclusión en la I+D de fármacos para el SNC.²⁴⁷ Así, con el objeto de mejorar la eficiencia del descubrimiento de nuevos fármacos con acción central, es prioritario implementar técnicas predictivas de paso de estos fármacos a través de la BHE, lo cual permite descartar aquellos candidatos no válidos en fases iniciales y así reducir las tasas de fracaso en etapas posteriores, como serían los ensayos clínicos, con el consiguiente ahorro económico.^{248, 249}

El tránsito de moléculas circulantes a través de la BHE *in vivo*, incluido el de los fármacos, está determinado por su tamaño molecular y propiedades fisicoquímicas, por su capacidad de unión a proteínas circulantes, así como por su velocidad de eliminación desde el cerebro a plasma y, finalmente, al exterior. Se han utilizado varios modelos para estimar el paso de moléculas a través de la BHE *in vivo*, *in vitro* e *in silico*. Debido a la complejidad fisiológica de los modelos para los estudios *in vivo*, generalmente utilizando roedores, estos modelos han quedado reservados para realizar los estudios farmacocinéticos en fases avanzadas preclínicas.

En las últimas décadas han surgido numerosos modelos *in vitro* de diferente grado de complejidad. Estos sistemas incluyen desde cultivos primarios de células endoteliales cerebrales, con mecanismos de expulsión y transporte similares al de la BHE, modelos celulares subrogados de origen generalmente epitelial, como las células intestinales Caco-2 o renales MDCK, hasta modelos no celulares, como columnas de HPLC o membranas artificiales, como el método PAMPA, los cuales mimetizan propiedades de las membranas biológicas.^{248, 249} A partir de los datos obtenidos en los anteriores modelos *in vivo* e *in vitro*, se han construido modelos de predicción *in silico* con el propósito de cribar, de manera virtual, un gran número de fármacos sin la necesidad de requerir preparaciones biológicas.²⁵⁰ Estos modelos *in silico* ofrecen sencillas guías sobre las propiedades moleculares que debería poseer una determinada molécula para favorecer su permeabilidad cerebral. Dichas propiedades pueden ser calculadas experimentalmente o estimadas mediante programas informáticos. De acuerdo con diversos autores, los métodos *in silico* para la predicción del paso a través de la BHE son suficientemente

eficientes en la fase inicial de evaluación de los compuestos, mientras que en las fases más avanzadas son más idóneos los modelos *in vitro* e *in vivo*.²⁵⁰ En el presente estudio se ha realizado una predicción *in silico* basada en las propiedades moleculares de los diferentes análogos de AO sintetizados.

Christopher Lipinski publicó en 2001 una revisión de las propiedades moleculares de más de 2.000 fármacos depositados en una gran base de datos de medicamentos (comercializados o en fase clínica avanzada).²⁵¹ El resultado del análisis proporcionó una serie de criterios relativos a las propiedades moleculares del fármaco que, en caso de cumplirlos, favorecerían su absorción oral proporcionándole una alta probabilidad de paso a través de las membranas celulares. Estos criterios, conocidos como la “regla de los cinco” o “regla de Lipinski” son los siguientes:

1. Peso molecular < 500 g/mol
2. Lipofilia o $clogP < 5$
3. N° grupos donadores de enlaces de hidrógeno (OH + NH) < 5
4. N° grupos aceptores de enlaces de hidrógeno (O + N) < 10

Es importante tener en cuenta que la “regla de cinco” (acuñada así por los múltiplos de cinco observados en las propiedades moleculares) no estima cuantitativamente la absorción oral, ni tampoco garantiza que compuestos que no rompen ninguno de los criterios de la regla sean necesariamente biodisponibles por vía oral. Sin embargo, si una molécula incumple dos o más de estos criterios, es muy probable que su absorción oral sea dificultosa. El 90 % de los fármacos que Lipinski y col. analizaron en su estudio cumplieron los anteriores criterios (excluyendo grupos farmacológicos como los de los antibióticos, antifúngicos, vitaminas y glucósidos cardíacos que, por sus características estructurales, solo atraviesan las membranas a través de transportadores específicos).

Con posterioridad, se han propuesto varios métodos de predicción de *drug-likeness* o “similitud con los medicamentos”, como el publicado por Hopkins y col.,²⁵² que intenta predecir las posibilidades que tiene una nueva molécula de alcanzar la clínica, en base a la similitud entre sus propiedades fisicoquímicas y las de los fármacos comercializados. Tras este estudio, se ampliaron a 8 los parámetros moleculares determinantes, incluyendo todos los propuestos por Lipinski, así como el número de anillos aromáticos (< 4), el número de enlaces con capacidad de rotación en la molécula (NBR, < 12), el área de superficie polar (PSA, < 150) y el número de grupos conocidos con potencial toxicidad (< 3).

3.2. Propiedades fisicoquímicas determinantes para el paso de la barrera hematoencefálica

El peso molecular (PM) de una molécula es un factor limitante para su paso a través de la BHE. Generalmente, el aumento del PM de los fármacos diseñados ha sido la estrategia más sencilla de desarrollo de fármacos para mejorar su afinidad, ya que ello lleva aparejado el aumento de interacciones con la diana biológica. Sin embargo, conforme se incrementa el PM, se eleva la dificultad para atravesar la BHE y, de manera general, aumentan los problemas farmacocinéticos.

Otro factor importante para el posible paso de la BHE es el balance entre la lipofilia y la solubilidad acuosa. La lipofilia de un fármaco o molécula, entendida como su capacidad para solubilizarse en un disolvente oleoso, está directamente relacionada con su permeabilidad a través de las bicapas lipídicas, como la BHE, y afecta a su solubilidad, absorción, distribución y metabolismo. La lipofilia se estima determinando el coeficiente de reparto (P , habitualmente expresada como $\log P$) del fármaco entre una fase lipófila (octanol) y una acuosa ($P = [\text{fármaco}]_{oc} / [\text{fármaco}]_{ac}$). No obstante, la estructura química del fármaco proporciona una estimación fiel de su $\log P$, por lo que este último valor puede ser calculado computacionalmente, expresando el valor obtenido como $\log P$ calculado ($c\log P$). Una alta lipofilia ($\log P$ alto) favorece la afinidad del fármaco por la diana biológica, la absorción intestinal y la penetración cerebral; en contraposición, disminuye su solubilidad, acelerando el metabolismo y, potencialmente, la toxicidad. Por el contrario, un $\log P$ bajo es indicativo de mayor solubilidad acuosa y menor afinidad por dianas biológicas, pero supondría una mayor especificidad por su diana biológica concreta, con lo que se reduciría la probabilidad de efectos secundarios no deseados. Teniendo en cuenta que muchos fármacos presentan propiedades ácido-base, estos pueden sufrir ionización dependiendo del pH del medio en el que se encuentren. Dado que los iones son mucho más polares que los compuestos neutros, la ionización complica la medida del valor de $\log P$, pues subestima el valor de la especie neutra en sustancias donde la forma ionizable sea la predominante, de tal forma que el valor del $\log P$ habrá de ser corregido teniendo en cuenta el pK_a y el pH. Por ello, en el caso de moléculas ionizables no se habla de P sino de D , o coeficiente de distribución, el cual corresponde a un coeficiente de reparto aparente que toma en cuenta la forma ionizada y no ionizada de la molécula.

El balance entre lipofilia y solubilidad acuosa debe ser preciso. Una solubilidad acuosa baja puede limitar la absorción intestinal del fármaco, comprometiendo la biodisponibilidad de la vía oral, mientras que una solubilidad acuosa alta dificulta la penetración por la BHE. La ausencia de una adecuada solubilidad de una nueva molécula que se pretende lanzar al mercado farmacéutico puede requerir estudios adicionales de formulación que incrementarían el coste del estudio y retrasarían la obtención de resultados. La solubilidad acuosa de un fármaco se puede estimar en

función del número de grupos donadores de enlaces de hidrógeno (la suma de NH y OH) y de grupos aceptores de enlaces de hidrógeno (estos mismos átomos sin H, sin dejar de contar si existen átomos de S y halógenos, igualmente electronegativos). A mayor número de los anteriores grupos, mayor solubilidad acuosa y peor permeabilidad a través de bicapas lipídicas.

El 80 % de los fármacos son ionizables ya que presentan grupos ácidos, básicos o ambos. La fracción ionizada es hidrosoluble y, si el tamaño del ion es grande, difunde muy poco a través de las membranas lipídicas. Por el contrario, la fracción no ionizada es liposoluble, por lo que es la única que difunde bien a través de dichas membranas. El grado de ionización de una molécula se expresa mediante el pK_a , que determina el pH al que un compuesto se encuentra en un 50 % en la forma ionizada. Se recomienda evitar compuestos muy ácidos o básicos, con un valor de pK_a inferior a 4 o superior a 10.

El último parámetro fisicoquímico a tener en cuenta a la hora de valorar el paso de fármacos a través de membranas biológicas es el área de superficie polar (PSA), que mide la polaridad de la molécula reflejando su hidrofilia. De esta manera, a mayor PSA mejor solubilidad acuosa y mayor dificultad para atravesar la BHE.

Numerosos estudios han tratado de inferir el rango de valores adecuados de los anteriores parámetros fisicoquímicos que permitan predecir el paso de una determinada molécula a través de la BHE. En general, los fármacos diseñados para actuar en el SNC son más lipófilos, más rígidos, con menos número de donadores de enlaces de hidrógeno, menos número de grupos cargados y menor PSA.²⁴⁹

Así, de acuerdo a la bibliografía para compuestos dirigidos al SNC,^{253, 254} hemos establecido como óptimos los siguientes parámetros para los análogos de AO descritos en esta Memoria de Tesis:

PM [160-450]	$N + O \leq 5$	$clogP < 5$	$PSA \leq 90$
	$NH + OH < 3$	$clogD_{pH=7.4} [0-4]$	$pK_a [4-10]$

3.3. Resultados y discusión del estudio del paso de barrera hematoencefálica de los análogos de ácido okadaico

El cálculo de las propiedades moleculares de los compuestos sintetizados en esta Tesis se ha llevado a cabo con programas de predicción computacional, de acuerdo a lo descrito en la parte experimental. En la Tabla 3, se resumen los valores obtenidos para cada uno de los compuestos.

Tabla 3. Propiedades moleculares de los compuestos sintetizados. Debajo de cada propiedad, se indica el rango óptimo de valores.

	PM [160-450]	N + O ≤ 5	NH + OH < 3	clogP < 5	PSA (Å²) ≤ 90
1	254,28	5	0	1,18	61,83
2	170,21	3	2	0,30	49,69
3	258,32	3	0	3,46	27,69
4	292,33	5	2	1,18	68,15
5	292,33	5	2	1,18	68,15
6	276,33	4	1	2,33	47,92
7	380,44	5	0	4,83	53,99
8	210,27	3	0	2,00	27,69
9	244,29	5	2	-0,28	68,15
10	244,29	5	2	-0,28	68,15
11	228,29	4	1	0,87	47,92
12	332,40	5	0	3,36	53,99
13	292,33	5	2	1,66	75,99
14	244,28	5	1	0,24	57,15
15	258,31	5	0	0,89	46,15
16	218,25	5	2	-0,82	68,15
17	332,51	5	1	1,56	57,15
18	330,50	5	0	2,46	53,99
19	328,52	4	0	2,57	36,92
20	214,26	4	1	0,20	47,92

De acuerdo a los valores obtenidos, todos los compuestos presentan propiedades moleculares adecuadas para poder permear la BHE por mecanismos de difusión pasiva.

En todos los casos, los valores relativos a clogP se encuentran dentro del rango establecido como adecuado. Si bien ninguno supera el valor de 5, algunos presentan valores cercanos a 0 o incluso inferiores, por la presencia de un diol (compuesto **2**, **9**, **10**, **16**) o un alcohol (**14**, **20**). Estos valores indican la mayor solubilidad de estos compuestos en disolventes polares que en apolares.

Los valores de pK_a no están recogidos en la Tabla 3 dado que ninguno de los análogos de AO sintetizados se encuentra ionizado a pH fisiológico o en un rango más amplio de pH. Esto

supone una ventaja para estos compuestos ya que, permaneciendo en su forma no ionizada, atravesarán fácilmente la membrana gastrointestinal y la BHE por difusión pasiva. Del mismo modo, en la Tabla 3 tampoco se indican los valores de $clogD$, parámetro empleado para sustancias ionizables.

En cuanto al PM, todos los análogos de AO se encuentran dentro del rango óptimo, siendo el compuesto **7** el de mayor peso molecular debido a la introducción de los dos grupos fenilos. De igual manera, todos los compuestos cumplen con los valores establecidos en cuanto al número de grupos de donadores y aceptores de enlaces de hidrógeno.

El PSA es uno de los parámetros fisicoquímicos que muestra más disparidad entre las moléculas sintetizadas. Los menores valores de PSA ($27,69 \text{ \AA}^2$) se observan en los compuestos que presentan el diol protegido en forma de acetal y un alqueno terminal en la cadena alifática (**3** y **8**). Por el contrario, el compuesto que mayor valor de PSA presenta es **13** ($75,99 \text{ \AA}^2$). Los dioles **4**, **5**, **9**, **10** y **16** también poseen valores altos de PSA ($68,15 \text{ \AA}^2$). Como se ha comentado con anterioridad, a mayor área de superficie polar, mayor hidrofilia, mejor solubilidad acuosa y mayor dificultad para atravesar la BHE. Sin embargo, a excepción del compuesto **13**, todos los compuestos tienen un valor de PSA $< 70 \text{ \AA}^2$, valor recomendado para aquellos compuestos dirigidos al SNC.²⁵⁵

El compuesto **1** será el único evaluado para ejercer su acción a nivel sistémico, además de a nivel cerebral. Debido a sus propiedades moleculares fisicoquímicas, podemos inferir que su administración vía oral sería factible.

En resumen, todos los análogos de AO descritos en esta Memoria de Tesis cumplen la “regla de los 5” de Lipinski por lo que, teóricamente, serían adecuados para una administración por vía oral.²⁵¹ De acuerdo a los criterios de Hopkins y col., también se cumplen los criterios de *drug-likeness*.²⁵²

3.4. Conclusiones parciales

- Todos los análogos de AO sintetizados cumplen los criterios de Lipinski para poder ser administrados por vía oral.
- Todos los derivados de AO presentan propiedades moleculares adecuadas para facilitar su permeabilidad cerebral por mecanismos de difusión pasiva.
- La alta hidrofilia de algunos compuestos observada por sus bajos valores de $clogP$ podría ser un factor limitante para el paso de estos a través de la BHE, si bien su PSA ofrece valores más idóneos.

4. EVALUACIÓN FARMACOLÓGICA DEL COMPUESTO 1 EN UN MODELO *IN VITRO* DE CÁNCER DE PULMÓN

Debido a la elevada incidencia y mortalidad que presenta el cáncer de pulmón, en concreto el NSCLC, y a la relación existente entre una deficiente actividad de PP2A y este tipo tumoral, se decidió evaluar si el compuesto **1**, el primer compuesto sintetizado en este estudio, era capaz de reactivar la actividad enzimática de PP2A. A continuación, se presentan los resultados obtenidos, así como la discusión de los mismos.

4.1. Estudio de *docking* molecular del compuesto 1 y PP2Ac

Se comenzó con el análisis, mediante técnicas de anclaje o *docking* molecular, de la interacción entre el compuesto **1** y PP2Ac. Para ello, se empleó la estructura de PP2A catalogada en el *Protein Data Bank* como 2IE4 que, como se ha comentado previamente, posee la subunidad C α y A α , así como el inhibidor AO coordinado en el sitio activo de la enzima. Para realizar el *docking*, la molécula de AO con la que se ha co-cristalizado se eliminó del complejo y se estudiaron las posibles interacciones entre el compuesto **1** en toda la superficie de la proteína, sin dirigir este compuesto a ninguna localización específica (protocolo denominado *docking* ciego) (Figura 38).

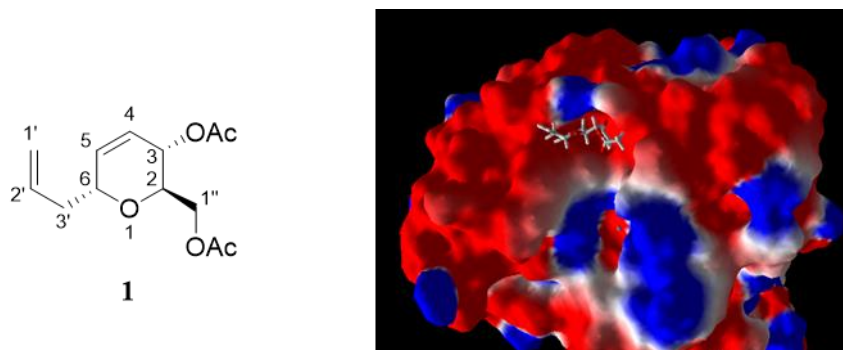


Figura 38. Estructura química del compuesto **1** y mapa electrostático de dicho compuesto dentro de la cavidad de PP2Ac.

La conformación más estable generada en la interacción del derivado **1** con PP2Ac mostró posibles interacciones entre el compuesto y los aminoácidos de la subunidad catalítica. Las tres principales interacciones químicas observadas dentro del bolsillo hidrofóbico de la enzima (Figura 39) son las siguientes: 1) el carbonilo del grupo acetiloxi en C3 forma un enlace de hidrógeno de 1,74 Å con el OH de Ser120, y el oxígeno unido a C3 forma un enlace hidrógeno de 2,52 Å con el indol NH de Trp200; 2) el oxígeno del pirano del compuesto **1** genera un enlace de hidrógeno de 2,84 Å con el imidazol NH de His191; y 3) el grupo propenilo de **1** se enfrenta a

Ala216 de manera que pudieran establecer una interacción hidrofóbica. Por otra parte, no se observan interacciones del derivado **1** con la Arg214, como se podía esperar de nuestro diseño, por lo que se descartarían posibles efectos inhibitorios del compuesto sobre PP2A.

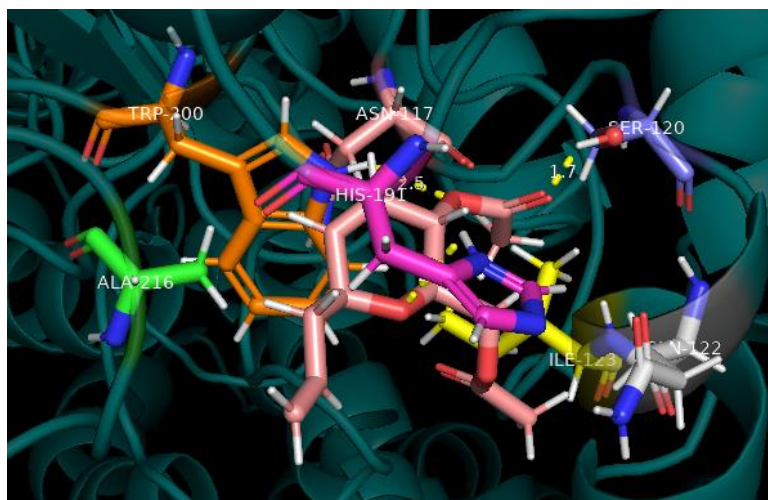


Figura 39. *Docking* molecular del complejo formado entre el compuesto **1** y PP2Ac. Principales interacciones entre el compuesto **1** (rosa claro) con los aminoácidos presentes en el bolsillo hidrofóbico de PP2Ac (azul claro). Cada aminoácido está representado por un color: Ser 120 (azul), His191 (fucsia), Ala216 (verde), Trp200 (naranja) e Ile123 (amarillo); los enlaces establecidos se representan en línea discontinua amarilla.

En general, y de manera muy relevante, nuestro estudio computacional predice que el compuesto **1** mostraría afinidad por un bolsillo periférico de unión en PP2Ac que no se encuentra en otras Ser/Thr fosfatasa. Además, este bolsillo de unión se encuentra lejos del sitio catalítico de PP2A. Por lo tanto, el compuesto **1** no inactivaría PP2A, pero sí que podría impedir la unión de los inhibidores a la enzima. Para sustentar esta hipótesis, se evaluó el efecto del compuesto **1** sobre la actividad fosfatasa de PP2A.

4.2. Efecto del compuesto 1 sobre la actividad de distintas isoformas de PP2A

Existen diferentes métodos, tanto radioactivos como colorimétricos, para medir la actividad fosfatasa en una muestra biológica de células o preparados proteicos purificados. Los métodos radioactivos son la manera clásica de medir la actividad fosfatasa utilizando sustratos marcados con $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$.²¹⁹ La mayor ventaja de este método es que mide, con gran precisión, los parámetros cinéticos de la reacción de desfosforilación, además de presentar menos problemas con compuestos interferentes como ocurre en el caso de los ensayos colorimétricos; sin embargo, este método presenta el gran inconveniente de su naturaleza radioactiva. En cuanto a los ensayos colorimétricos, el método del fosfato de *p*-nitrofenol (pNPP, empleado en el siguiente apartado 5.

Evaluación del perfil neuroprotector de los compuestos sintetizados) y el de verde malaquita son los más utilizados.²¹⁹ El verde malaquita es un compuesto capaz de formar complejos con los fosfatos libres en solución acuosa, los cuales absorben a una longitud de onda de 620 nm.²⁵⁶ Se trata de un ensayo preciso pero bastante complejo de realizar, ya que requiere el aislamiento por inmunoprecipitación de la enzima fosfatasa, la limpieza de la muestra biológica de fosfatos y la necesidad de añadir exógenamente un sustrato o péptido fosforilado, lo que además encarece el ensayo.²¹⁹

En este trabajo de Tesis seleccionamos el método de verde malaquita para estudiar en detalle como afectaba el compuesto **1** a la actividad fosfatasa de distintas isoformas de PP2A. Para ello, se utilizó el fosfopéptido comercial K-R-pT-I-R-R como sustrato, en presencia o ausencia de AO para inhibir la actividad enzimática y remedar lo que ocurre en NSCLC, con o sin compuesto **1**. Existen muchos fosfopéptidos comercialmente disponibles que mimetizan un sitio conocido de fosforilación en una proteína particular. Podemos diferenciar dos etapas en este ensayo: la inmunoprecipitación de la enzima fosfatasa y la medida de la actividad de esta mediante el comentado método de verde malaquita.

El ensayo comenzó con la transfección de células HEK 293T con la subunidad de PP2A C α (gen *PPP2CA*) marcada con GFP, utilizando esta última como proteína de cebo o “bait”, que facilitó el aislamiento de las isoformas de PP2A con la subunidad C α por el método *pull-down* (detalles experimentales descritos en *Materiales y métodos*). Entre las técnicas más usadas en proteómica para los estudios de interacción proteica se encuentran aquellas basadas en el fenómeno de la afinidad, con el método de *pull-down* como uno de los más ampliamente utilizado *in vitro* para detectar o confirmar interacciones entre múltiples proteínas. Otra de las aproximaciones experimentales para este tipo de estudios se basa en procesos de inmunoprecipitación. La diferencia fundamental que existe entre ambas técnicas es que la inmunoprecipitación utiliza anticuerpos inmovilizados para capturar el complejo proteico, mientras que el *pull-down* utiliza proteínas purificadas y marcadas para su atrapamiento.²⁵⁷

Para realizar el ensayo de verde malaquita, este método se puso a punto determinando la mínima concentración de AO necesaria para inhibir la actividad fosfatasa. El registro de la actividad fosfatasa se realizó a dos tiempos distintos, utilizando varias diluciones del extracto enzimático concentrado para cerciorarnos que no se estaba trabajando en condiciones de saturación. La actividad fosfatasa del constructo de PP2A purificado que presentaba C α se inhibió un 31 % a los 30 min de exposición a AO 15 nM (Figura 40A). Dicha actividad fosfatasa, comprometida por la acción de AO, se recuperó parcial, pero significativamente, en presencia del compuesto **1** a 50 μ M; concentraciones inferiores del compuesto no produjeron ningún tipo de efecto significativo (Figura 40A). Por esta razón, se seleccionó la concentración de 50 μ M para

evaluar, posteriormente, la capacidad del compuesto **1** para recuperar la actividad fosfatasa de las principales isoformas de PP2A que regulan la supervivencia y proliferación celular. Como se comentó en el apartado *Introducción*, las isoformas de PP2A que poseen subunidades B α o B' α son mediadoras importantes en la desfosforilación de sustratos de ciertas fosfoproteínas, como p-Akt y p-ERK1/2.^{81, 258} Nuestros resultados muestran que las isoformas PP2A-B α y PP2A-B' α poseen sensibilidades ligeramente diferentes a la acción inhibitoria de AO, requiriéndose concentraciones del inhibidor de 15 o 20 nM, respectivamente, para lograr el mismo grado de inhibición (~ 30 %) (Figura 40). Cabe destacar que el compuesto **1** tuvo un efecto similar en las células HEK 293T transfectadas con B α (PPP2R2A) o B' α (PPP2R5A) (Figura 40).

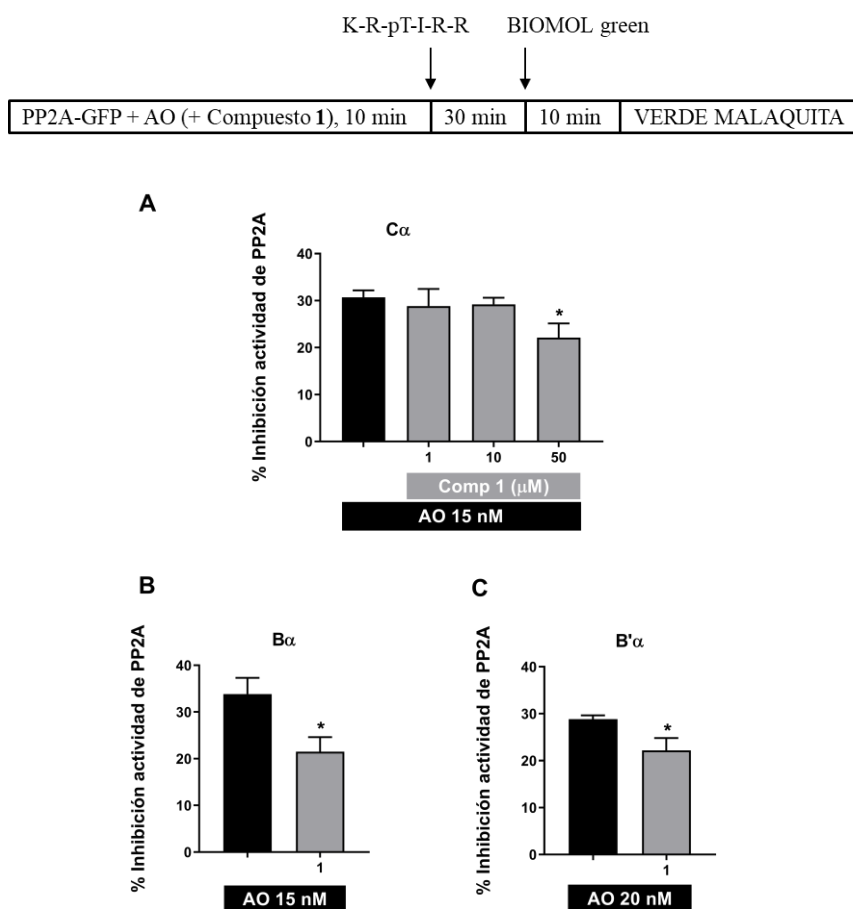


Figura 40. Actividad PP2A fosfatasa medida por el método de verde malaquita, utilizando el fosfopéptido K-R-pT-I-R-R. Las isoformas de PP2A fueron aisladas mediante el método de *pull-down* de células HEK 293T transfectadas con GFP-C α (A), GFP-B55 α (B α ; B) o GFP-B56 α (B' α ; C), usando GFP como proteína cebo. El fosfopéptido fue hidrolizado por PP2A durante 30 min. Los datos representan el porcentaje de inhibición de PP2A, normalizados frente a la actividad de los precipitados tratados solo con vehículo (100 % actividad). Los datos se expresan como la media \pm SEM de al menos 4 experimentos. * $p < 0,5$.

Una vez confirmado que el compuesto **1** era capaz de producir una recuperación parcial de la actividad fosfatasa de PP2A *in vitro*, la cual había sido previamente comprometida por la acción

del AO, nos propusimos estudiar si el anterior efecto del compuesto podría tener un efecto beneficioso en la terapia antitumoral con cisplatino en el NSCLC.

4.3. Evaluación del efecto citotóxico del compuesto 1

El efecto de concentraciones crecientes del compuesto 1 sobre la viabilidad celular fue evaluado en la línea celular humana de adenocarcinoma de pulmón A549 utilizando el ensayo de MTT, según se describe en *Materiales y métodos*. Los resultados del ensayo, utilizando como referencia el efecto citotóxico del fingolimod (FTY720), el PAD más ampliamente estudiado,²⁵⁹ son recogidos en la Figura 41.

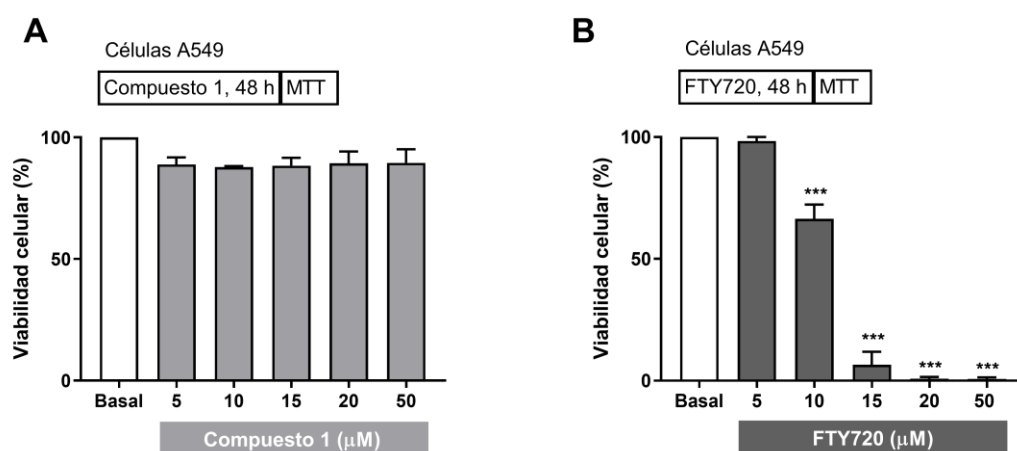


Figura 41. Efecto del compuesto 1 (A) y FTY720 (B) sobre la viabilidad celular. El ensayo se realizó en la línea celular humana de adenocarcinoma de pulmón A549 utilizando el método de reducción del MTT. Tras 48 h de incubación de las células con los correspondientes compuestos a las concentraciones de 5, 10, 15, 20 y 50 µM, se determinó la viabilidad celular. Los datos se expresan como la media \pm SEM de al menos 4 experimentos, normalizados frente a la viabilidad celular de las células no tratadas (Basal). *** $p < 0,001$.

Los resultados anteriores muestran que el compuesto 1 no presentó toxicidad *per se* a ninguna de las concentraciones ensayadas en las células A549 (Figura 41A), a diferencia de FTY720, que redujo drásticamente, y de forma concentración-dependiente, la viabilidad celular (Figura 41B). Ha sido ampliamente descrito en la literatura que el FTY720 ejerce su acción como antagonista del receptor 1 de S1P una vez fosforilado, pero, además, regula positivamente la actividad de PP2A, presumiblemente por interferir con el inhibidor I₂/SET.²⁶⁰ Este último efecto de FTY720, de indudable interés terapéutico, se ve empañado porque las concentraciones requeridas para la citada regulación positiva de la actividad PP2A son mucho más altas que aquellas que producen citotoxicidad (Figura 41B).²⁶¹ Además, el efecto inmunosupresor de FTY720 desaconseja su empleo en quimioterapia.²⁶² En contraposición, el compuesto 1 no redujo la viabilidad celular ni siquiera a la concentración más alta empleada (50 µM), concentración a la

que demuestra un perfil de PAD. A raíz de estos resultados, se planteó la hipótesis de que el compuesto **1**, gracias a su potencial perfil activador de fosfatasa, pero carente de propiedades citotóxicas, podría ser utilizado como coadyuvante en combinación con un agente quimioterapéutico en el tratamiento del NSCLC.

4.4. El compuesto 1 restaura la apoptosis inducida por cisplatino comprometida por efecto de nicotina en células A549

Tras los hallazgos anteriores mostrando que el compuesto **1** era capaz de recuperar parcialmente la actividad fosfatasa de PP2A inhibida por el AO (Figura 40), nos planteamos si este compuesto, a través del anterior mecanismo, podría favorecer la desfosforilación (inactivación) de ciertas fosfoproteínas cinasas implicadas en la supervivencia y proliferación celular y que contribuyen a la resistencia a la quimioterapia inducida por nicotina. Para contrastar esta hipótesis, se escogió el cisplatino por ser uno de los agentes quimioterapéuticos más utilizados y las células A549.

Está ampliamente demostrado que la nicotina induce la fosforilación de algunas cinasas implicadas en la supervivencia celular, así como la inactivación de la proteína proapoptótica Bax.²⁶³ Por ello, en esta parte del estudio, se evaluó la apoptosis inducida por cisplatino y cómo la nicotina afectaba a la misma, tanto en presencia como en ausencia del compuesto **1**. Los datos de citometría de flujo con tinción de yoduro de propidio (PI) y Anexina V-FITC mostraron interesantes resultados (Figura 42). En primer lugar, se confirmó que el compuesto **1** no era citotóxico, como ya habíamos previamente constatado mediante el ensayo de MTT (Figura 41A). La incubación celular con cisplatino produjo un incremento del 33 % de la apoptosis. Esta muerte celular provocada debida a cisplatino, al igual que en el caso de otros agentes citotóxicos basados en derivados de platino, se debe al entrecruzamiento de las hebras de ADN para así inhibir su síntesis.⁶⁵ La adición del compuesto **1** al cisplatino no produjo cambios significativos en el porcentaje de apoptosis celular (36 %) respecto a la inducida por cisplatino solo, mientras que la adición de nicotina al cisplatino sí produjo una reducción significativa de dicha apoptosis (21 %). Esta pérdida del efecto citotóxico de cisplatino inducida por nicotina ha sido ampliamente estudiada en la literatura por ser la base del fracaso terapéutico de diversos tratamientos antitumorales en pacientes fumadores.²⁶³⁻²⁶⁶ En este escenario, es interesante observar que la administración del compuesto **1**, junto con nicotina y cisplatino, fue capaz de restaurar el valor de apoptosis celular (31 %) inducida por cisplatino solo (Figura 42).

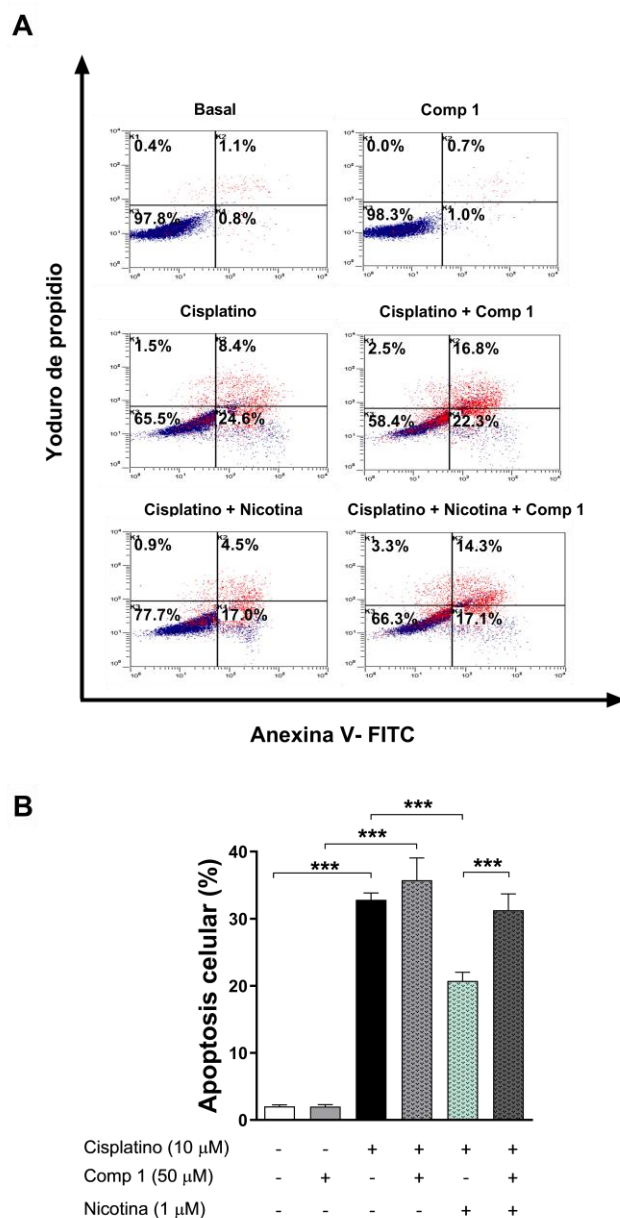


Figura 42. El compuesto **1** restaura el efecto proapoptótico de cisplatino comprometido por nicotina. La apoptosis en las células A549 fue determinada por citometría de flujo con yoduro de propidio y Anexina V-FITC. (A) Diagrama de dispersión representativo de cada condición experimental expresando: necrosis (Anexina-V/PI⁺; cuadrante superior izquierdo), apoptosis tardía (Anexina-V/PI⁺; cuadrante superior derecho), apoptosis temprana (Anexina-V/PI⁺; cuadrante inferior derecho) o células vivas (Anexina-V/PI⁻; cuadrante inferior izquierdo). (B) Porcentaje de células apoptóticas (apoptosis temprana más tardía) en respuesta a los distintos tratamientos. Los datos se expresan como la media \pm SEM de al menos 5 experimentos independientes. *** $p < 0,001$.

Así, la medida de la apoptosis celular mostró que el compuesto **1** restablecía por completo la capacidad proapoptótica de cisplatino previamente deteriorada por nicotina. Este efecto del compuesto **1**, y su falta de citotoxicidad intrínseca a la concentración utilizada, le proporcionan una enorme ventaja respecto al FTY720. Los experimentos siguientes fueron diseñados para identificar las dianas moleculares sobre las que el compuesto **1** podría estar ejerciendo este efecto.

4.5. Efecto del compuesto 1 sobre la expresión de diversas proteínas reguladas por PP2A en células A549

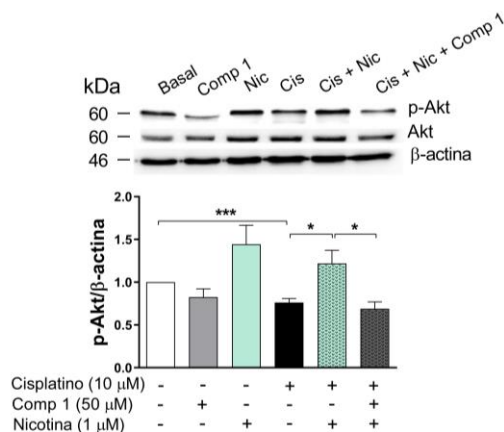
PP2A es un regulador negativo de varias vías de señalización celular que promueven crecimiento celular, proliferación y supervivencia, incluidas las vías de señalización PI3K/Akt/mTOR o MAP/ERK, y proteínas directamente responsables de la apoptosis celular, como la familia Bcl-2.²⁶⁷⁻²⁶⁹ Con objeto de identificar si alguna de estas vías o proteínas eran afectadas por el compuesto **1** a la hora de prevenir la aparición de quimiorresistencia inducida por nicotina, se realizaron experimentos de *immunoblot* para determinar cambios de expresión y/o actividad (fosforilación) de algunas de estas proteínas, como Akt y ERK1/2, así como de la proteína proapoptótica Bax, dado que la mayoría de las líneas celulares de cáncer de pulmón, incluida A549, no tienen niveles detectables de Bcl-2 pero sí altos niveles endógenos de Bax.²⁶³

Los resultados recogidos en la Figura 43, utilizando células A549, muestran en primer lugar que el compuesto **1**, administrado de forma individual, produjo una disminución significativa de los niveles de fosforilación de ERK1/2 (p-ERK1/2) sin afectar la fosforilación de Akt (p-Akt) ni el nivel de expresión de Bax, lo cual explicaría el hecho de que este compuesto no modifique, por sí solo, la apoptosis celular determinada por citometría de flujo (Figura 42). En segundo lugar, se observó que la incubación con nicotina, tal como ha sido descrito en la literatura, produjo un incremento en la fosforilación de Akt y ERK1/2. Es un hecho probado que la fosforilación y consiguiente activación de Akt inducida por nicotina conduce a un aumento en la fosforilación de Bax (en Ser184), lo cual resulta en un cambio conformacional de esta última proteína en su dominio transmembrana y la consiguiente inactivación de su función proapoptótica.⁷⁸ Es importante resaltar también que la elevada expresión de Bax en la mayoría de los tipos celulares de cáncer de pulmón humano,²⁶³ en detrimento de otras proteínas de la familia Bcl-2, hace presuponer que Bax podría desempeñar un papel más importante que Bcl-2 en la regulación de la supervivencia celular inducida por nicotina en los anteriores tipos tumorales.

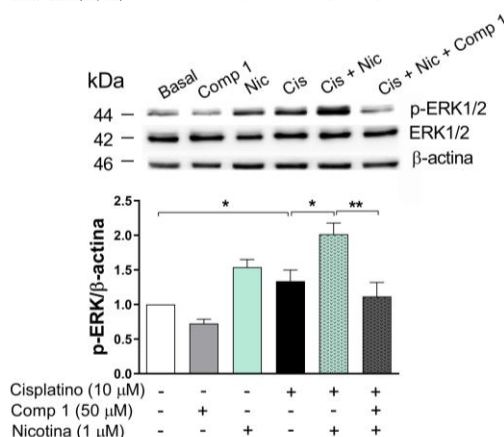
Finalmente, nuestros datos también revelan que la administración de cisplatino provocó un aumento de la fosforilación de ERK1/2 y de la expresión de Bax, como ha sido descrito en la literatura.⁷⁹ El agente quimioterapéutico también producía una disminución en la fosforilación de Akt, lo que se correlaciona con la disminución de supervivencia celular inducida por el fármaco. La administración conjunta de cisplatino y nicotina, tal como ha sido previamente publicado, produjo un aumento de la fosforilación y actividad de Akt y ERK1/2, lo cual pone en marcha vías de señalización de supervivencia que contrarrestan los efectos proapoptóticos de cisplatino y, por tanto, promueven la resistencia al fármaco.⁷⁹ Por otra parte, nuestros datos muestran que la adición de nicotina al cisplatino reducía significativamente el nivel de expresión de Bax inducido por el fármaco, lo cual contrarrestaría también la capacidad citotóxica del cisplatino (Figura 43).

La Figura 43 también muestra como, en presencia de cisplatino, el compuesto **1** previene el aumento de fosforilación de Akt y ERK1/2 inducido por nicotina, a la vez que restaura el nivel de expresión de Bax deteriorado por la nicotina. Este efecto de **1**, en presencia de cisplatino y nicotina, indica que este compuesto es capaz de restaurar la actividad proapoptótica de cisplatino al abolir la acción antiapoptótica de nicotina. Trabajos previos han demostrado que la activación de PP2A en células de cáncer de pulmón humano regula la desfosforilación de Bax y favorece su inserción en la mitocondria, restableciendo así su función proapoptótica que había sido abolida por la fosforilación (en Ser184) mediada por la activación de Akt inducida por nicotina.⁸⁰

A



B



C

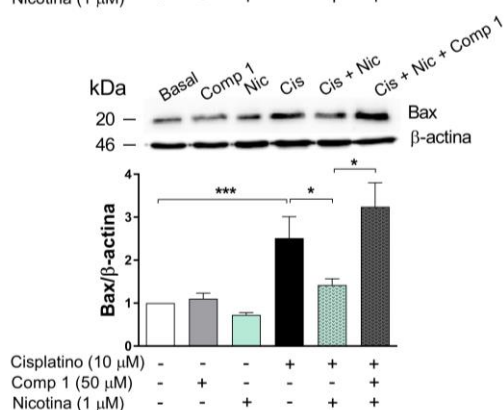


Figura 43. Análisis de la expresión proteica de p-Akt, p-ERK1/2 y Bax en células A549 expuestas a diferentes tratamientos. Las células fueron incubadas con cisplatino durante 48 h, en ausencia o presencia de nicotina y/o el compuesto **1**, el cual fue añadido 24 h antes y durante la incubación con cisplatino. (Superior) *Immunoblots* de experimentos representativos. (Inferior) Media \pm SEM de 5 experimentos independientes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

En base a los resultados que se acaban de describir, se puede concluir que el compuesto **1**, al restaurar parcialmente la actividad deteriorada de PP2A en cáncer de pulmón, es capaz de prevenir la resistencia a cisplatino inducida por nicotina. Por tanto, nuestros datos sugieren que este compuesto podría ser un cabeza de serie interesante utilizable de modelo en el desarrollo de fármacos que prevengan el fenómeno de quimiorresistencia inducida por el consumo de tabaco en pacientes con NSCLC. Adicionalmente, los resultados expuestos en esta parte de nuestro estudio permiten validar PP2A como un regulador maestro de los mecanismos de apoptosis y supervivencia en NSCLC.

4.6. Mecanismo de acción del compuesto 1

Existen varios mecanismos por los que la actividad de PP2A podría estar disminuida en cáncer de pulmón no microcítico, aunque la contribución de cada uno de ellos no está aclarada en la literatura. Se ha descrito una mayor expresión de inhibidores celulares de PP2A, como SET³⁸ o CIP2A,^{76, 270} pero también una regulación negativa o mutaciones de subunidades específicas de PP2A,²⁷¹ así como un mayor número de modificaciones postraduccionales que conducirían a una menor actividad de la enzima.²² Dado que el compuesto **1** actúa, presumiblemente, por acción directa sobre PP2Ac, suponemos que los efectos celulares de dicho compuesto serán el resultado de interferir en el lugar de unión de PP2A y sus inhibidores endógenos, los cuales, probablemente, también se dirigen, directa o indirectamente, a PP2Ac.^{156, 272, 273} Sin embargo, cabría preguntarse por qué el compuesto **1** es capaz de revertir completamente la quimiorresistencia inducida por nicotina (Figura 42), teniendo en cuenta que la recuperación de la actividad fosfatasa inhibida por el AO, medida por el método de verde malaquita, es más bien moderada (Figura 40). Para responder a esta cuestión, debe mencionarse que la medida de la actividad fosfatasa se realiza mediante un experimento *in vitro* utilizando un potente inhibidor, como es el AO, para inactivar PP2A. Nuestros datos indican claramente que la afinidad de AO por PP2A es mucho mayor que la del compuesto **1**; por tanto, se necesita una concentración relativamente alta de nuestro compuesto para competir con AO. La mayor afinidad de AO por PP2A, en comparación con la del compuesto **1**, podría ser debida, entre otras razones, a la contribución adicional del fragmento de AO C1–C5 a la unión que, de hecho, es la parte de AO que inactiva PP2A (esta es la razón por la que, deliberadamente, habíamos eliminado dicho fragmento del diseño de los fármacos activadores de PP2A, como es el caso del compuesto **1**). En contraposición al ensayo de la medida de actividad de PP2A, el experimento de apoptosis celular se realizó en la línea celular A549, donde la inhibición de PP2A se debe únicamente a la acción de sus inhibidores, como SET o CIP2A. Estos, además de ser inhibidores de la enzima menos potentes que AO, muestran una afinidad por la misma mucho menor. Esto explicaría por qué los efectos de una concentración

determinada del compuesto **1** son mucho más espectaculares en la medida de apoptosis en las células A549 que en los experimentos *in vitro* de verde malaquita sobre la enzima purificada.

Han sido propuestos e identificados diversos mecanismos por los que la actividad fosfatasa de PP2A podría ser incrementada en NSCLC. Algunos autores abogan por la regulación al alza de la expresión de distintas subunidades de PP2A con el fin de aumentar su actividad antitumoral. En 2015, Kim y col. publicaron que la cardamomina, una chalcona aislada de varias plantas como *Alpinia katsumadai*, era capaz de suprimir la transición epitelio-mesenquimal inducida por TGF- β 1 en células A549 a través de la restauración de la expresión de PP2A, resaltando así el papel de esta chalcona como potencial fármaco antimetastásico.²⁷⁴ En relación con la estrategia basada en bloquear los inhibidores endógenos en NSCLC, existen varios trabajos en la literatura. Liu y col. publicaron en 2015 que el inhibidor SET se encuentra sobreexpresado en NSCLC, lo cual contribuye a un mal pronóstico de evolución clínica. Estos autores mostraron que la alta expresión de SET no solo se correlacionaba con estadios tumorales avanzados y metástasis en ganglios linfáticos regionales, sino que también este inhibidor está desregulado en células de NSCLC y juega un papel oncogénico clave al promover la proliferación celular, la formación de colonosferas y la invasividad como resultado de la pérdida de función del supresor tumoral PP2A. Los mismos autores emplearon el antagonista de SET, FTY720, para demostrar que la activación farmacológica de PP2A producida por este fármaco redujo la viabilidad celular y el crecimiento tumoral en células NSCLC.³⁸ Como ya había sido publicado, el FTY720 ejerce su acción activadora de PP2A mediante su unión a SET.²⁶⁰ A pesar de este interesante efecto farmacológico, como se ha mencionado previamente, el uso de FTY720 no parece adecuado como fármaco en la terapia antineoplásica dado su carácter inmunosupresor.²⁶² En el mismo sentido, cabe mencionar la niclosamida, un fármaco antihelmíntico aprobado para el tratamiento de infecciones por cestodos en humanos, el cual ha sido estudiado como potencial agente antitumoral en diversos tipos de cáncer. Kim y col. describieron en 2017 que la niclosamida inhibía la proliferación de células A549, así como la formación de colonias y de esferas tumorales a través del bloqueo del inhibidor endógeno de PP2A, CIP2A.¹⁷⁰ Por último, también existen ejemplos en la literatura de moléculas capaces de aumentar la actividad de PP2A en NSCLC al acelerar la degradación de los inhibidores endógenos. Así, compuestos como el celastrol o la etoxisanguinarina han demostrado ser capaces de promover la degradación de CIP2A y, como consecuencia, inactivar p-Akt en células A549. De este modo, ambos compuestos han sido capaces de aumentar el efecto citotóxico del cisplatino en células de cáncer de pulmón.^{162, 163}

De acuerdo a los antecedentes que se acaban de exponer, nuestro estudio continuó con el diseño de experimentos encaminados a evaluar la posibilidad de que el compuesto **1** esté restaurando parcialmente la actividad de PP2A en células A549 al promover la degradación de los inhibidores endógenos de la enzima (SET o CIP2A) sobreexpresados en estas células. Así, se

realizaron experimentos de *western blot* para evaluar si el compuesto **1** modificaba el nivel de expresión de los inhibidores endógenos (Figura 44).

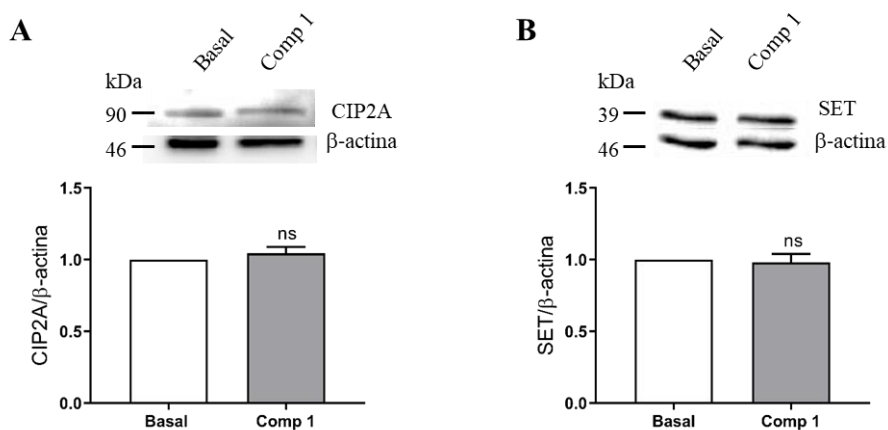


Figura 44. Efecto del compuesto **1** sobre la expresión proteica de CIP2A (A) y SET (B) en células A549. El compuesto **1** (50 μ M) fue incubado durante 24 h. (Superior) *Immunoblots* representativos. (Inferior) Medias \pm SEM de 5 experimentos independientes. ns = no significativo.

Los resultados muestran que el compuesto **1** no afecta el nivel de expresión de CIP2A o SET. Este hallazgo apoya la hipótesis de que el compuesto **1** previene la resistencia a cisplatino inducida por nicotina a través de la reactivación parcial de PP2A al interferir con la unión de los inhibidores endógenos a la enzima. Esta reactivación enzimática produce la desfosforilación de p-Akt y p-ERK1/2 y un aumento de expresión de la proteína proapoptótica Bax.

4.7. Discusión general

La desregulación y disminución de la actividad fosfatasa de PP2A es una observación común en un gran número de tumores. También ha sido reportado que la restauración de la función fosfatasa de PP2A a través de distintos mecanismos inhibe la progresión tumoral.

El activador de PP2A más ampliamente estudiado, FTY720, además de interferir con la unión SET-PP2A, también es capaz de incrementar la actividad de PP2A a través de otros mecanismos, incluyendo la disminución de la expresión de CIP2A o la disminución de la fosforilación de la enzima en Tyr307, aunque el mecanismo de acción que explicaría estos efectos no está claro.^{275, 276} La eficacia clínica y bioseguridad de FTY720 fue inicialmente evaluada en pacientes con esclerosis múltiple. A pesar de su buen historial de seguridad, se han descrito efectos adversos a dosis bajas, como una disminución transitoria de la frecuencia cardíaca y bloqueo auriculoventricular al inicio del tratamiento, edemas maculares o el desarrollo de ciertos cánceres de piel tras su uso prolongado. Estos efectos adversos, junto con su acción

inmunosupresora, representan una limitación para posicionarlo como un nuevo fármaco antitumoral, ya que este último efecto farmacológico de FTY720 parece requerir concentraciones mayores de las necesarias para antagonizar el receptor de S1P. Como alternativa, se han desarrollado algunos derivados de FTY720, como el OSU-2S, que tiene una mayor sensibilidad y especificidad, así como menor toxicidad y efectos secundarios. Otro derivado es el MP07-66, que carece de efectos inmunosupresores y muestra efectos antitumorales prometedores en leucemia linfocítica crónica por disociación del complejo SET-PP2A que conduce a la reactivación de PP2A.²⁷⁷ En este sentido, el compuesto **1** presenta una notable ventaja sobre el FTY720 al carecer de toxicidad en los modelos evaluados.

La resistencia a los fármacos antineoplásicos es una de las causas más importantes de fracaso terapéutico en NSCLC que conduce a la recurrencia del tumor y la progresión de la enfermedad. Aunque algunas terapias dirigidas, como las representadas por los TKIs, han mostrado cierta eficacia en pacientes con cáncer de pulmón avanzado que presentan ciertas mutaciones en el EGFR, la mayoría de los pacientes también desarrollan resistencia adquirida a estos agentes. La resistencia a los anteriores fármacos, inevitablemente, limita la eficacia de todas las terapias dirigidas, incluidas las de los TKIs. Recientemente, se ha descrito en la literatura que ciertos SMAPs son capaces de mejorar la resistencia al TKI afatinib a través de la degradación del inhibidor de PP2A, CIP2A, en un modelo murino.²⁷⁸ Sin embargo, el tratamiento de elección en NSCLC continúa siendo los agentes derivados de platino, donde la aparición de resistencias también es un fenómeno recurrente. En este sentido, administración del compuesto **1** ha demostrado mejorar la eficacia de cisplatino comprometida por la acción de la nicotina. El tratamiento con nicotina simula un modelo de quimiorresistencia producido por el consumo de tabaco, el cual se caracteriza por la promoción de rutas de supervivencia y proliferación celular mediadas por fosfoproteínas. Así, los presentes resultados pueden tener también relevancia en todos aquellos escenarios donde los anteriores mecanismos están exacerbados por otras causas, como por ejemplo la sobreexpresión de inhibidores endógenos o la sobreactividad de proteínas reguladoras, características clínicas de pacientes con peor pronóstico. En todos estos casos, el compuesto **1**, como modelo de PAD directo, puede ejercer un papel beneficioso. Para evaluar esto último, y con el objeto de reforzar el interés terapéutico del nuevo compuesto, deberán llevarse a cabo experimentos *in vivo* adicionales, bien con el propio compuesto **1** o con un análogo mejorado de nuestra síntesis, para analizar el efecto de dichos compuestos en el desarrollo tumoral de xenotrasplantes de células A549 (o de otras líneas celulares de cáncer de pulmón) implantados en ratones inmunosuprimidos o “desnudos”.

4.8. Conclusiones parciales

- Los estudios de *docking* molecular muestran que el compuesto **1** presenta afinidad por el bolsillo hidrofóbico de PP2Ac.
- El compuesto **1** es capaz de reactivar parcialmente la actividad fosfatasa de distintas isoformas de PP2A comprometida por la presencia del inhibidor AO, dicha actividad fue determinada por el método de verde malaquita.
- El compuesto **1** carece de toxicidad *per se* en la línea celular humana A549 de adenocarcinoma de pulmón.
- Los datos de apoptosis y expresión proteica, determinados por citometría de flujo e *immunoblot* en células A549, muestran que nicotina produce una pérdida de la capacidad proapoptótica de cisplatino. Este efecto de nicotina es prevenido en presencia del compuesto **1** como resultado de la disminución de la expresión de p-Akt y p-ERK1/2 y la estabilización de la expresión de la proteína proapoptótica Bax.
- En general, el presente estudio revela que el compuesto **1**, a través de la restauración parcial de la actividad de PP2A deficitaria en muchos tipos de tumores, podría prevenir la resistencia a cisplatino inducida por nicotina en pacientes con NSCLC que continúan fumando durante la quimioterapia.

5. EVALUACIÓN DEL PERFIL NEUROPROTECTOR DE LOS COMPUESTOS SINTETIZADOS

Una vez sintetizados los derivados del fragmento central de AO, se decidió estudiar sus propiedades activadoras de Ser/Thr fosfatasas y, en consecuencia, si dicha actividad les conferiría un perfil neuroprotector en una situación de neurodegeneración como la observada en la EA. Para ello, se realizaron estudios de *docking* molecular, se evaluó su papel activador de fosfatasas y se plantearon experimentos para conocer si los compuestos eran capaces de proteger a las neuronas frente a estímulos tóxicos relacionados con la EA.

5.1. Estudio de *docking* molecular de los compuestos y PP2Ac

La posible interacción entre los diversos análogos del fragmento C19–C27 de AO sintetizados en esta Tesis y PP2Ac ha sido confirmada mediante técnicas de *docking* molecular. Con el fin de abarcar las diferentes estructuras sintetizadas, se han realizado cálculos de *docking* con las entidades más representativas de cada estructura, siendo elegidos los compuestos **9**, **14** y **20** (Figura 45). El compuesto **1** fue ya estudiado en el apartado 4.1. *Estudio de docking molecular del compuesto 1 y PP2Ac*, donde se mostraron destacadas interacciones con la enzima. Para llevar a cabo los presentes estudios de *docking* molecular se eligió igualmente la estructura 2IE4 de PP2A depositada en el *Protein Data Bank*.

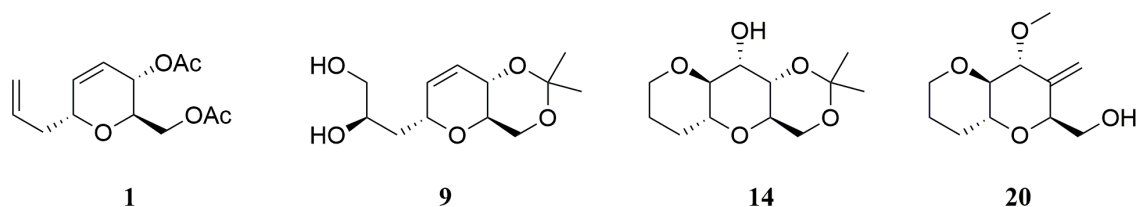


Figura 45. Estructura de los compuestos estudiados mediante *docking* molecular.

La conformación más estable generada en la interacción del derivado **9** con PP2Ac mostró posibles interacciones con los aminoácidos Ser120 (interacción tipo enlace de hidrógeno entre uno de los metilos de **9**, el que se sitúa más hacia el interior del bolsillo, y el hidroxilo del aminoácido, $d = 2,5 \text{ \AA}$), His191 (enlace de hidrógeno entre el oxígeno del pirano de **9** y el NH del resto imidazol del aminoácido, $d = 2,7 \text{ \AA}$), Ala216 (interacción hidrofóbica entre el metileno de la cadena propenífica y el metilo del aminoácido, $d = 2,2 \text{ \AA}$) e Ile123 (interacción hidrofóbica con un metilo del acetal situado hacia el exterior de la cavidad y la cadena hidrocarbonada del aminoácido, $d = 3,0 \text{ \AA}$) (Figura 46). En general, se establecen interacciones con PP2Ac muy similares a las que presentaba el compuesto **1**.

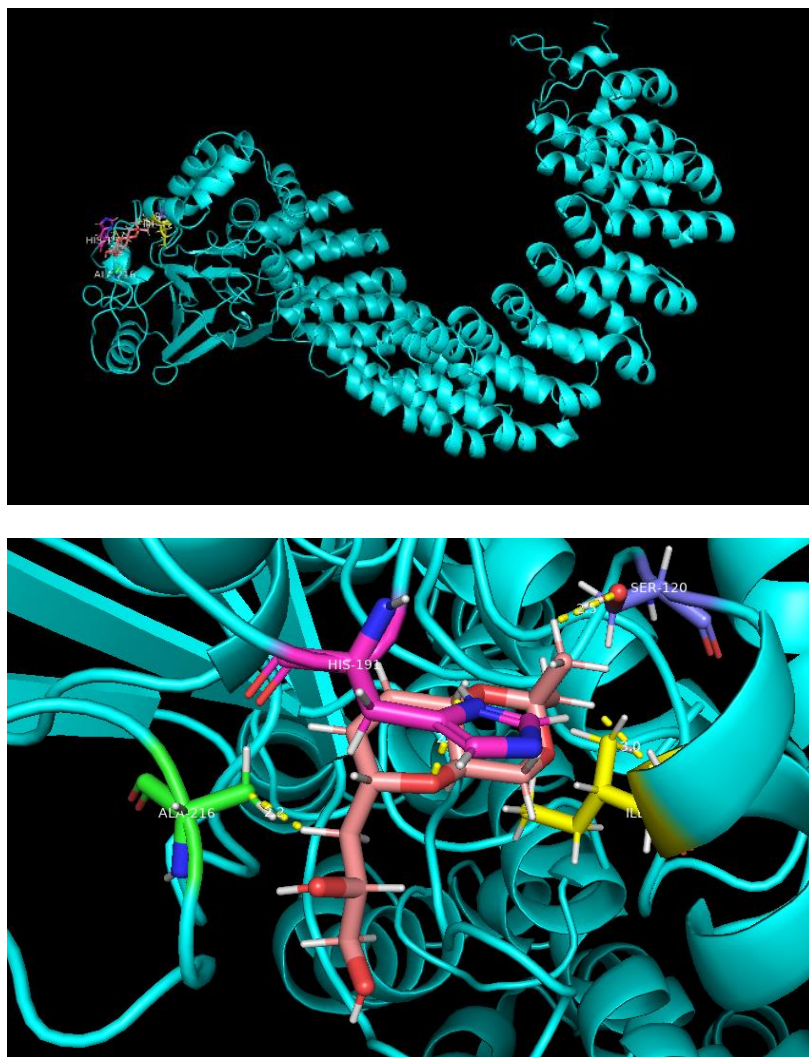


Figura 46. (Superior) *Docking* del complejo formado por la estructura 2IE4 de PP2A y el compuesto **9**. (Inferior) Principales interacciones entre el compuesto **9** (rosa claro) con los aminoácidos presentes en el bolsillo hidrofóbico de PP2Ac (azul claro). Cada aminoácido está representado por un color: Ser 120 (azul), His191 (fucsia), Ala216 (verde) e Ile123 (amarillo); los enlaces establecidos se representan en línea discontinua amarilla.

El complejo entre el derivado **14** y PP2Ac reveló interacciones entre un metilo del acetal con la Ser120 (tipo enlace de Van der Waals, $d = 2,3 \text{ \AA}$) y entre el otro metilo con la Ile123 (interacción hidrofóbica, $d = 2,7 \text{ \AA}$). Estas interacciones son comunes con los otros compuestos estudiados hasta el momento. También se observa una interacción entre el tetrahidropirano central y el NH del resto imidazol de la His191, $d = 2,7 \text{ \AA}$ (Figura 47).

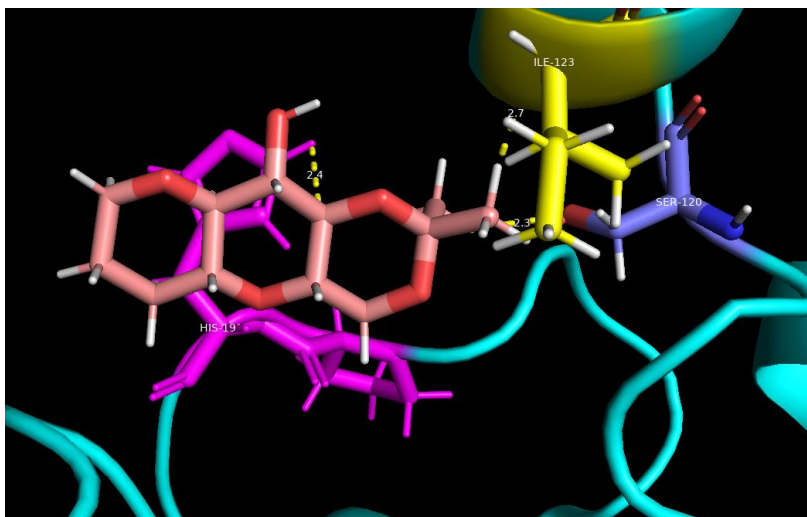


Figura 47. Principales interacciones observadas en el *docking* entre el compuesto **14** (rosa claro) con los aminoácidos presentes en el bolsillo hidrofóbico de PP2Ac (azul claro). Cada aminoácido está representado por un color: Ser 120 (azul), His191 (fucsia) e Ile123 (amarillo); los enlaces establecidos se representan en línea discontinua amarilla.

Por último, el compuesto **20** adopta una pose capaz de establecer interacciones con la Ser120 (interacción tipo enlace de Van der Waals entre un hidrógeno del alqueno exocíclico y el OH del aminoácido, $d = 2,5 \text{ \AA}$), His191 (interacción entre el tetrahidropirano principal y el NH del resto imidazol del aminoácido, $d = 2,2 \text{ \AA}$), Ala216 (interacción hidrofóbica entre el tetrahidropirano de la parte izquierda del compuesto y el metilo del aminoácido, $d = 1,6 \text{ \AA}$), Gln122 (interacción tipo Van der Waals entre el hidrógeno del metilo unido al hidroxilo del compuesto y el NH del resto amida del aminoácido, $d = 2,8 \text{ \AA}$), y un enlace tipo Van der Waals entre un hidrógeno del alqueno y el oxígeno de la amida primaria del aminoácido, $d = 2,6 \text{ \AA}$), Trp200 (dos enlaces de hidrógeno entre el OH libre de **20** y el oxígeno del tetrahidropirano más cercano a este con el NH indólico del aminoácido, respectivamente a $d = 1,9 \text{ \AA}$ y $d = 2,6 \text{ \AA}$) y Asn117 (enlace de hidrógeno entre el OH libre de **20** y el oxígeno de la amida del aminoácido, $d = 1,7 \text{ \AA}$) (Figura 48). Cabe destacar que el compuesto **20** no solo mantiene las uniones que establecen el resto de los compuestos, sino que también presenta uniones nuevas, lo que podría incrementar su grado de afinidad por el bolsillo hidrofóbico.

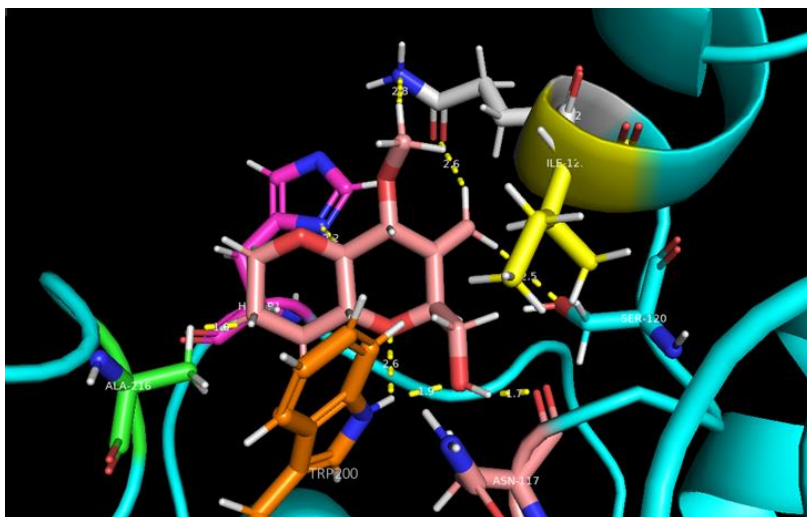


Figura 48. Principales interacciones observadas en el *docking* entre el compuesto **20** (rosa claro) con los aminoácidos presentes en el bolsillo hidrofóbico de PP2Ac (azul). Cada aminoácido está representado por un color: Ser 120 (azul), His191 (fucsia), Ala216 (verde), Gln122 (gris), Trp200 (naranja), Asn117 (rosa claro) e Ile123 (amarillo); los enlaces establecidos se representan en línea discontinua amarilla.

Los resultados de *docking* para los cuatro modelos descritos en esta Memoria de Tesis permiten deducir los residuos clave de la interacción entre los análogos truncados de AO sintetizados y PP2Ac (Figura 49).

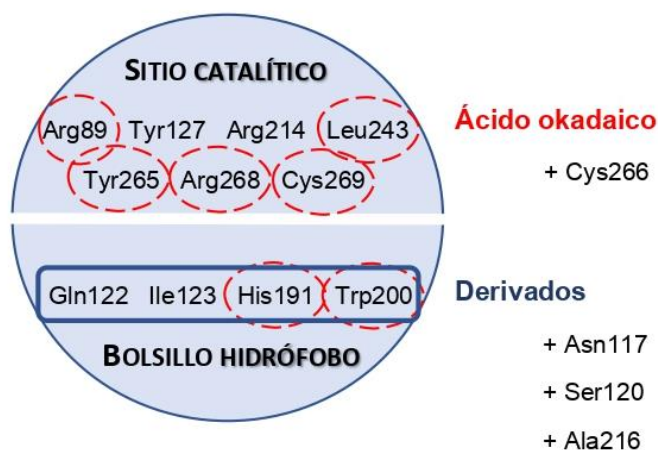


Figura 49. Esquema representativo de los aminoácidos de PP2Ac que participan en la interacción con el AO o con sus derivados sintetizados en el presente estudio. Rodeados por la línea roja discontinua aparecen los aminoácidos que interaccionan con AO; por la línea azul continua, aquellos que interaccionan con los derivados de AO.

Los análogos del fragmento central de AO sintetizados y evaluados en esta Memoria se unen al bolsillo hidrofóbico de PP2A (conformado por los aminoácidos Gln122, Ile123, His191, Trp200), en lugar de unirse a los aminoácidos con los que contacta el propio fragmento C19–C27 de AO. Al realizar el estudio de *docking* molecular, observamos que el hidroxilo del compuesto

9 no se une a la Arg214 presente en el sitio catalítico de PP2Ac, como sí lo hace el hidroxilo análogo presente en la estructura completa de AO. No en vano, al diseñar nuestros compuestos, optamos por proteger dicho grupo hidroxilo para mejorar las propiedades fisicoquímicas del compuesto e impedir su posible unión al sitio catalítico de la enzima, lo que conduciría a una inhibición de su actividad fosfatasa. La incorporación del grupo metoxi al compuesto **9** permite una nueva interacción con la Gln122 que, si bien no era esperada, es deseable. De igual manera, en base a los trabajos recogidos en la literatura, se esperaba que el alqueno exocíclico presente en el derivado final no participaría en la unión a PP2Ac como ocurre en la estructura completa del AO. Los estudios de *docking* muestran que dicho alqueno parece aportar gran afinidad por el sitio de unión, estableciendo enlaces tipo Van der Waals fuertes con la Ser120 y la Gln122 a 2,5 y 2,6 Å, respectivamente. Por tanto, estos hallazgos, lejos de suponer un contratiempo en nuestra investigación, otorgan mayor consistencia a la hipótesis de que los derivados de AO propuestos presentan afinidad por la subunidad catalítica de PP2Ac sin interaccionar con los aminoácidos responsables de su actividad enzimática y, de este modo, podrían competir con la unión de los inhibidores endógenos y así mantener un adecuado nivel de su actividad fosfatasa.

5.2. Toxicidad *per se* de los derivados de AO

El estudio farmacológico de los compuestos descritos en esta Memoria comenzó con la evaluación de la toxicidad *per se* de los derivados de AO mediante la medida de la viabilidad celular por el método de la reducción del MTT. Como modelos celulares para este estudio, se utilizaron la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y y los cultivos primarios de neuronas de corteza total de embrión de rata.

Si bien la evaluación de la toxicidad *per se* de un nuevo compuesto es un proceso necesario en el descubrimiento de posibles fármacos, en el caso de los compuestos sintetizados en esta Memoria de Tesis, esta evaluación cobra especial importancia ya que las moléculas estudiadas son derivados de un compuesto con una alta toxicidad. En primer lugar, se realizó una curva de toxicidad de los compuestos a diferentes concentraciones en las células SH-SY5Y (Figura 50).

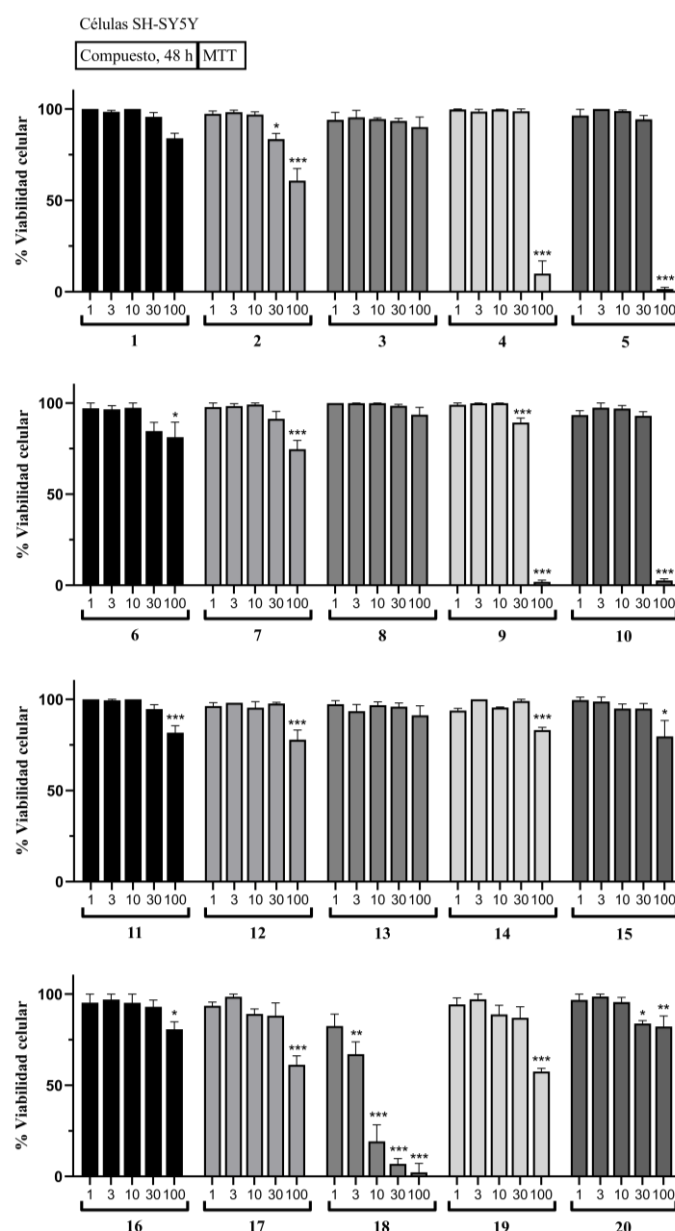


Figura 50. Toxicidad *per se* de los derivados de AO en células SH-SY5Y. Tras 48 h de incubación de las células con los compuestos a las concentraciones de 1, 3, 10, 30 y 100 μM , se midió la viabilidad celular por el método del MTT. Los datos se expresan como la media \pm SEM de 4 experimentos, normalizados frente a la viabilidad celular registrada en ausencia de los compuestos. *** $p < 0,001$, * $p < 0,05$.

A excepción de **18**, los compuestos no presentaron citotoxicidad a concentraciones inferiores a 30 μM . El mismo tipo de estudio de toxicidad se repitió en neuronas procedentes de cultivos primarios de corteza total de embrión de rata (Figura 51). Con los datos derivados del estudio de toxicidad en células SH-SY5Y, ateniéndonos a motivos éticos para minimizar el número de animales, en este segundo estudio de toxicidad solo fueron evaluadas dos únicas concentraciones de los compuestos (10 y 30 μM). Destaca de nuevo el compuesto **18**, que redujo más de un 50 % la viabilidad celular a 10 μM y un 100 % a 30 μM . El resto de los compuestos no presentaban citotoxicidad a concentraciones inferiores de 30 μM .

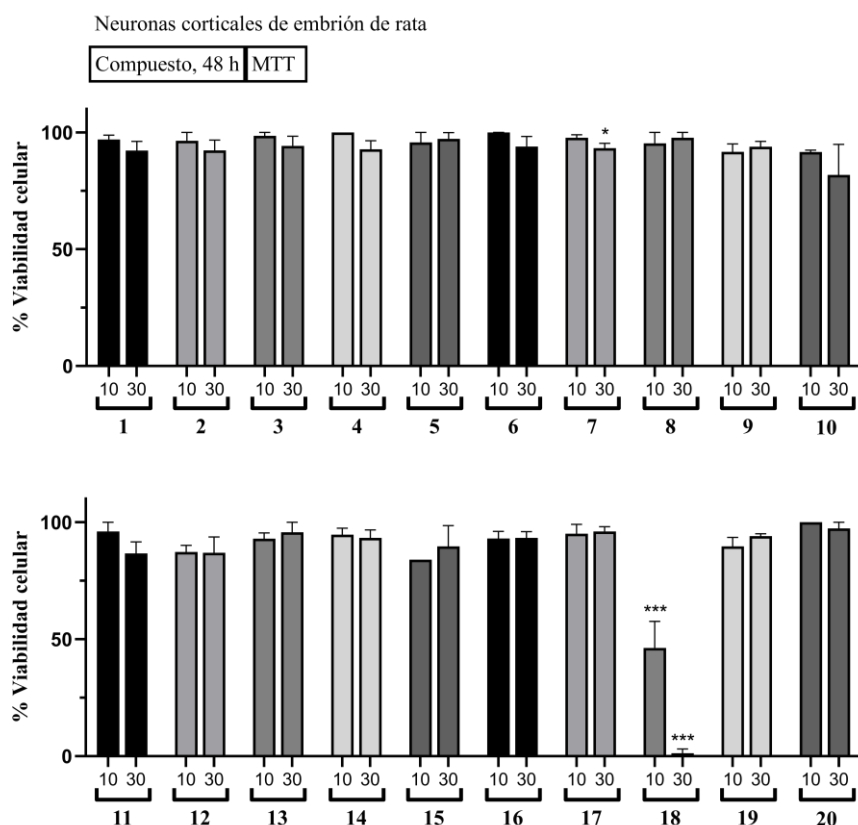


Figura 51. Toxicidad *per se* de los derivados de AO en neuronas de corteza total de embrión de rata. Tras 48 h de incubación con los compuestos a las concentraciones de 10 y 30 μM , se determinó la viabilidad celular por el método del MTT. Los datos se expresan como la media \pm SEM de al menos 3 experimentos, normalizados frente a la viabilidad celular de las células no tratadas. *** $p < 0,001$, * $p < 0,05$.

A raíz de los resultados obtenidos en el estudio de toxicidad, y con objeto de caracterizar las propiedades farmacológicas de los compuestos, se escogió la concentración de 1 μM como regla general para el cribado de los compuestos en esta Tesis Doctoral.

5.3. Efecto sobre las Ser/Thr fosfatasas

El método del *p*NPP, como se ha comentado anteriormente, es un ensayo colorimétrico para medir actividad fosfatasa. El fosfato de *p*-nitrofenol actúa como sustrato cromogénico para la mayoría de las enzimas fosfatasas (Tyr fosfatasas y Ser/Thr fosfatasas), las cuales, al desfosforilarlo, producen *p*-nitrofenol, que en condiciones alcalinas da lugar a *p*-nitrofenolato con gran absorbancia a 405 nm.²¹⁹ A diferencia del ensayo de verde malaquita utilizado previamente, el método del *p*NPP es sencillo y económico, por lo que es el más adecuado a la hora de realizar el cribado farmacológico de un gran número de compuestos, de ahí que haya sido el elegido para los experimentos que se describirán a continuación. Sin embargo, conviene resaltar que el método del *p*NPP presenta el inconveniente de ser inespecífico ya que determina la actividad fosfatasa total de la muestra. No obstante, en presencia de un inhibidor específico, como el AO o la

citostatina, se acepta que los cambios en la absorbancia se deben a la actividad de las enzimas Ser/Thr fosfatasas, entre las cuales PP2A es la más abundante y sensible a AO o citostatina.²¹⁹ A pesar de ello, además de medir la actividad fosfatasa total de las muestras en presencia de AO, se realizaron experimentos en presencia de NaVO₃, un inhibidor específico de las enzimas Tyr fosfatasas.²⁷⁹ En estas condiciones experimentales, y dado que la actividad de AO sobre PPP es insensible a NaVO₃,²¹ la actividad registrada corresponderá, en exclusiva, a la de las enzimas Ser/Thr fosfatasas.

La puesta a punto del ensayo se llevó a cabo en células SH-SY5Y utilizando una concentración de AO que fuera capaz de inhibir PPP pero que no afectara significativamente la viabilidad celular en la escala de tiempo utilizada. De esta manera, la medida de la actividad enzimática no se vería influida por la reducción en el número de células viables. Así, en comparación con los experimentos de neuroprotección descritos más adelante, se disminuyó la concentración de AO de 20 a 15 nM, una concentración todavía adecuada para inhibir PP1 y PP2A,^{219, 280} y se disminuyó el tiempo de exposición al tóxico de 20 a 18 h. En estas condiciones experimentales, el AO disminuyó la actividad fosfatasa total un 29 %, de manera estadísticamente significativa, sin afectar a la viabilidad celular. Esta suave caída de la actividad fosfatasa es suficiente para poder valorar si alguno de los compuestos sintetizados consigue restaurar la actividad Ser/Thr fosfatasa inhibida por el AO. Además, el método del *p*NPP permite constatar la hipótesis que expusimos en la predicción computacional sobre la capacidad de los compuestos de interaccionar con el bolsillo hidrofóbico presente en la subunidad C de PP2A, sin afectar a su sitio catalítico. Si la anterior hipótesis es correcta, algunos de los compuestos sintetizados podrían evitar la unión de inhibidores de PP2A, como el AO o endógenos, sin afectar a la actividad fosfatasa de la enzima.

La Tabla 4 recoge el porcentaje de actividad fosfatasa total que consigue restaurar cada uno de los compuestos ensayados, a la concentración de 1 µM, tras el deterioro de dicha actividad por la presencia del inhibidor AO (15 nM) durante 18 h. Todos los derivados, a excepción del compuesto **13**, restablecieron la actividad fosfatasa a niveles iguales o superiores a los producidos por memantina (10 nM), empleada como fármaco de referencia por su descrita propiedad para activar PP2A.¹⁷⁷ Es interesante resaltar que el compuesto **1**, evaluado en la sección anterior de *Resultados y discusión* en células tumorales A549, también muestra excelentes resultados en el método de *p*NPP en células SH-SY5Y. Si bien ya habíamos demostrado el perfil activador de PP2A de este compuesto a 50 µM mediante el método de verde malaquita, los presentes resultados, aunque no del todo extrapolables, puesto que en este caso es un experimento que se realiza en cultivos celulares y no en enzimas purificadas, validan el empleo de *p*NPP como método general para medir actividad fosfatasa de un elevado número de moléculas. La Figura 52

muestra gráficamente cómo la actividad fosfatasa en cultivos celulares de SH-SY5Y, inhibida por AO (15 nM), es recuperada en presencia de algunos compuestos.

Tabla 4. Efecto de los derivados **1–20** sobre la actividad fosfatasa total. Tras 24 h de incubación con los compuestos, las células SH-SY5Y se expusieron a AO 15 nM y a los compuestos a 1 μ M durante 18 h. El control del experimento, la memantina, se administró a 10 nM. La actividad fosfatasa se midió por el método del pNPP.

Compuesto	% Actividad fosfatasa total	Compuesto	% Actividad fosfatasa total
Basal	100	10	92 \pm 2 ***
AO	71 \pm 1 ###	11	88 \pm 4 ***
Memantina	83 \pm 2 ***	12	85 \pm 4 ***
1	91 \pm 7 ***	13	75 \pm 4 n.s.
2	92 \pm 4 ***	14	89 \pm 3 ***
3	91 \pm 8 ***	15	79 \pm 4 *
4	88 \pm 4 ***	16	89 \pm 5 ***
5	95 \pm 3 ***	17	91 \pm 7 ***
6	92 \pm 6 ***	18	86 \pm 5 ***
7	86 \pm 5 ***	19	85 \pm 5 ***
8	80 \pm 3 ***	20	92 \pm 4 ***
9	95 \pm 4 ***		

Los datos se expresan como la media \pm SEM de al menos 5 experimentos. ### $p < 0,001$, respecto a las células sin tratar (Basal); *** $p < 0,001$, * $p < 0,05$ y n.s. = no significativo, respecto a las células tratadas solo con AO.

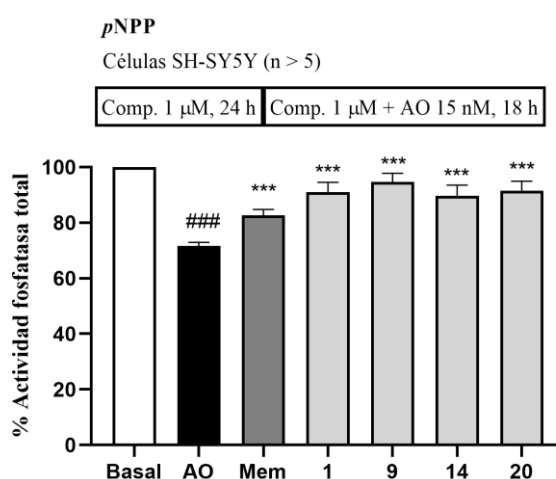


Figura 52. Representación gráfica de la recuperación de la actividad Ser/Thr fosfatasa inhibida por AO por parte de algunos de los compuestos sintetizados. Los datos se expresan como la media \pm SEM de al menos 5 experimentos, normalizados frente a la actividad fosfatasa observada en ausencia de los compuestos. Los compuestos se evaluaron a 1 μ M y la memantina (Mem) a 10 nM. ### $p < 0,001$, respecto a las células sin tratar (Basal); *** $p < 0,001$, respecto a las células tratadas solo con AO.

Resultados muy similares se obtuvieron al medir la actividad fosfatasa en presencia de 1 mM del inhibidor de Tyr fosfatasas NaVO_3 ²¹ (Tabla 5). En este último caso, solo se evaluaron algunos de los compuestos sintetizados debido a las siguientes razones. En primer lugar, se producían altos errores inherentes a la medida dado que la actividad Tyr fosfatasa supone un 70 % de la actividad fosfatasa celular total,²⁷⁹ por lo que su supresión con NaVO_3 deja un valor muy bajo de absorbancia residual en la que es difícil detectar cambios. En segundo lugar, no se observaron diferencias remarcables entre los resultados con o sin NaVO_3 , por lo que, como se ha comentado anteriormente, se puede aceptar que la actividad registrada en ausencia de NaVO_3 corresponderá a la de las enzimas Ser/Thr fosfatasas.²¹⁹ Por último, estando claro que el uso de NaVO_3 no aportaba información adicional a la caracterización farmacológica de los compuestos sobre PP2A, se repitieron estos experimentos empleando un inhibidor más selectivo que el AO, como es la citostatina, con el fin de encontrar un método de cribado específico para medir la actividad fosfatasa exclusiva a PP2A, y así poder confirmar rigurosamente que todos los compuestos sintetizados eran capaces de modular la actividad de esta fosfatasa en concreto.

Tabla 5. Efecto de varios derivados del fragmento central de AO sobre la actividad Ser/Thr fosfatasa. Tras 24 h de incubación con los compuestos, las células SH-SY5Y se expusieron a AO 15 nM y a los compuestos a 1 μM durante 18 h. El control del experimento, la memantina, se empleó a 10 nM. La actividad fosfatasa se midió por el método del pNPP, en presencia de NaVO_3 .

Compuesto	% Actividad Ser/Thr fosfatasa
Basal	100
AO	60 \pm 3 ###
Memantina	82 \pm 4 ***
1	71 \pm 5 *
2	77 \pm 7 *
3	84 \pm 5 ***
4	88 \pm 9 ***
6	78 \pm 6 **
8	79 \pm 5 **

Los datos se expresan como la media \pm SEM de al menos 5 experimentos. ### $p < 0,001$, respecto a las células sin tratar (Basal); *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ y n.s. = no significativo, respecto a las células tratadas solo con AO.

El AO es una toxina muy potente, pero poco selectiva frente a las diferentes PPP, presentando unos valores de CI_{50} de alrededor de 15 nM para PP1, de 0,1 nM para PP2A y PP4, y de 3,5 nM para PP5.²⁸⁰ Como ya se ha comentado previamente, en general, los efectos celulares causados por AO se atribuyen a su efecto inhibidor sobre PP2A,²¹⁹ dado que esta última PPP es

la más sensible a AO y la que contribuye más a la actividad fosfatasa total. Aun así, no se puede despreciar la contribución de PP1 a los efectos celulares del AO, puesto que las concentraciones de la toxina empleadas en nuestros modelos experimentales para inhibir PP2A (15–20 nM), también afectarían a PP1. Existen inhibidores más selectivos de PP2A (Tabla 6), como la fostriecina, pero su inestabilidad química (es sensible a la oxidación, la luz y cambios en el pH) debido a la lactona α,β -insaturada limita su utilización.²⁸¹ La citostatina, como se ha comentado en el apartado 1.1. *Relación estructura-actividad del ácido okadaico y otros inhibidores selectivos de PP2A*, interacciona con PP2Ac de manera similar a la fostriecina, gracias igualmente a la presencia de la lactona α,β -insaturada. Sin embargo, la citostatina resulta más estable que la fostriecina debido a la incorporación de un grupo metilo en la posición *para* respecto a la lactona, actuando este grupo, presumiblemente, como escudo estérico metabólico.

Tabla 6. Potencia de varias toxinas sobre la actividad de distintas proteínas fosfatasas. Datos recogidos de Swingle y col. para AO y fostriecina,²⁸⁰ y de Kawada y col. para citostatina.²⁸²

	PP1 CI ₅₀ (nM)	PP2A CI ₅₀ (nM)	PP1/PP2A	PP2B CI ₅₀ (nM)
AO	15	0,1	150	4.000
Fostriecina	45.000	1,5	>1.000	>100.000
Citostatina	>250.000	210	>1.000	>250

De igual manera a como se seleccionó la concentración de AO con la que ensayar el efecto inhibidor sobre PP2A en células SH-SY5Y, se escogió también la concentración de citostatina de forma que inhibiera la actividad de PP2A sin afectar a la viabilidad celular (evaluada por MTT). Así, tras 24 h de preincubación de las células con los compuestos, se añadió citostatina 2 μ M y después de 18 h se midió la actividad fosfatasa (Tabla 7). La administración de citostatina produjo una reducción de la actividad fosfatasa basal de PP2A del 28 %. La mayoría de los compuestos reducen de forma altamente significativa el efecto inhibidor de citostatina sobre la actividad fosfatasa. El compuesto **13** no recuperó la anterior actividad fosfatasa comprometida por citostatina, al igual que tampoco había recuperado aquella inhibida por el AO. Mientras tanto, los compuestos **11** y **12** no fueron capaces de recuperar la actividad fosfatasa inhibida por citostatina, pero sí aquella comprometida por AO. Resulta complicado presentar un estudio relación estructura-actividad capaz de explicar estos resultados y, también es arriesgado afirmar en base a la metodología empleada en nuestro estudio, que los compuestos **11** y **12** actúan sobre PP1 y no sobre PP2A. No obstante, de manera generalizada, sí que podemos afirmar que casi todos los derivados del fragmento central de AO sintetizados en esta Tesis actúan sobre PP2A siendo

capaces de restablecer una actividad fosfatasa comprometida de manera similar a como lo hace el fármaco de referencia memantina.

Tabla 7. Efecto de los derivados **1–20** sobre la actividad fosfatasa de PP2A. Tras 24 h de incubación con los compuestos, las células SH-SY5Y se expusieron a citostatina 2 μ M y a los compuestos a 1 μ M durante 18 h. El control del experimento, la memantina, se empleó a 10 nM. La actividad fosfatasa se midió por el método del pNPP.

Compuesto	% Actividad fosfatasa PP2A	Compuesto	% Actividad fosfatasa PP2A
Basal	100	10	85 \pm 7 *
Citostatina	72 \pm 2 ###	11	72 \pm 4 n.s.
Memantina	84 \pm 4 **	12	74 \pm 4 n.s.
1	82 \pm 6 *	13	73 \pm 7 n.s.
2	88 \pm 5 ***	14	95 \pm 3 ***
3	86 \pm 7 *	15	94 \pm 2 ***
4	85 \pm 6 **	16	92 \pm 3 ***
5	85 \pm 5 **	17	88 \pm 3 ***
6	87 \pm 7 *	18	94 \pm 1 ***
7	82 \pm 5 *	19	94 \pm 4 ***
8	81 \pm 6 *	20	91 \pm 4 ***
9	84 \pm 4 **		

Los datos se expresan como la media \pm SEM de al menos 5 experimentos. ### $p < 0,001$, respecto a las células sin tratar (Basal); *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ y n.s. = no significativo, respecto a las células tratadas con citostatina.

Los experimentos con citostatina presentan un interés adicional. Se ha descrito que el AO es capaz de formar dímeros, los cuales muestran una conformación espacial con mayor superficie hidrofóbica que aumenta la permeabilidad de las membranas celulares y, de esta manera, su citotoxicidad.²⁸³ Una posible dimerización entre el AO y los análogos truncados de AO estudiados en esta Tesis podría enmascarar la acción del AO, proporcionando falsos positivos de los compuestos sobre la actividad de las fosfatasas. El empleo de citostatina como inhibidor alternativo de PP2A, el cual no es capaz de realizar esta dimerización, permite descartar esos falsos positivos y confirmar nuestros resultados.

Como se ha comentado anteriormente en la sección de *Introducción*, el compuesto EHT, a través de la activación de PP2A, fue capaz de prevenir el déficit cognitivo en ratones a los que se les han infundido oligómeros de β A.²⁸⁴ De manera más relevante, el ion selenato (SeO_4^{2-}) es un activador de PP2A potente y específico para heterotrímeros compuestos por la subunidad B/PR55,

la subunidad responsable de la desfosforilación de tau, mediante la estabilización del complejo PP2A/tau.²⁸⁵ En varios modelos animales de EA, se ha observado que dosis bajas de Na₂SeO₄, administrado por vía oral, reducen la hiperfosforilación de la proteína tau previniendo la formación de los NFT y la consiguiente neurodegeneración y déficit cognitivo.²⁸⁶ En fase IIa de ensayos clínicos, se ha demostrado que la sal sódica de selenato es segura y bien tolerada en pacientes con EA.²⁸⁷ En cualquier caso, son escasos los compuestos descritos en la literatura capaces de aumentar la actividad Ser/Thr fosfatasa de PP2A en el contexto de la EA. Por ello, en el contexto de búsqueda de nuevos fármacos para el tratamiento de la EA en la que se encuadra parte del presente estudio, resulta muy interesante que la mayoría de los compuestos sintetizados posean esta capacidad.

No obstante, hay que considerar que una activación directa de las enzimas Ser/Thr fosfatasas por encima de un valor fisiológico óptimo es igualmente indeseable, pues podría inducir numerosos efectos adversos como resultado de la alteración del fino equilibrio existente entre los procesos de fosforilación/desfosforilación de proteínas implicados en funciones celulares claves.²⁸⁸ Por este motivo, y con el fin de descartar una posible activación de las anteriores fosfatasas por parte de la familia de PAD obtenida, se evaluó la capacidad de cada compuesto sintetizado para activar *per se* dicha actividad fosfatasa. Ninguno de los compuestos, ensayados a 1 µM en las células SH-SY5Y, modificó de manera significativa la actividad fosfatasa determinada en condiciones “Basales” por el método del pNPP (datos no mostrados). Estos resultados indican que los compuestos sintetizados no tienen un efecto potenciador *per se* de la actividad fosfatasa celular en ausencia de AO o citostatina. Por tanto, parece que es necesaria la presencia de un inhibidor de PP2A con el que competir para poder recuperar parte de la actividad de la enzima comprometida por el inhibidor.

5.4. Modelo de hiperfosforilación de tau inducido por AO en células SH-SY5Y

Como se ha mencionado en la *Introducción*, el AO es una toxina ampliamente utilizada como herramienta farmacológica en el estudio de la EA ya que desencadena fenómenos que conducen a una neurodegeneración con características histopatológicas similares a las observadas en la EA. Esta neurodegeneración es el resultado de la potente inhibición de las fosfatasas PP1 y PP2A ejercida por la toxina, la cual provoca hiperfosforilación de la proteína tau y la consiguiente formación de ovillos neurofibrilares. También se ha descrito que el AO produce acumulación de βA, muerte neuronal y otros cambios moleculares, como disfunción colinérgica, activación astrogliar, neuroinflamación, disfunción mitocondrial, disminución del flujo sanguíneo cerebral y déficit cognitivo.^{138, 289}

Numerosos estudios han corroborado que el modelo de neurodegeneración por hiperfosforilación de tau *in vivo*²⁹⁰ puede ser reproducido *in vitro* utilizando células SH-SY5Y expuestas a AO, a bajas concentraciones (nanomolar) y un periodo de tiempo que oscila entre 4 y las 48 h.²⁹¹ Con estas premisas, los siguientes experimentos se diseñaron para analizar la capacidad de los distintos análogos del fragmento central de AO (1–20) para prevenir el daño neuronal por hiperfosforilación de tau en cultivos de células SH-SY5Y. Los compuestos fueron preincubados durante 24 h a la concentración de 1 μ M, manteniéndolos durante el periodo de incubación celular (20 h) con el AO a la concentración de 20 nM (Tabla 8). La memantina (10 nM) fue utilizada como fármaco de referencia dada su probada capacidad para activar PP2A.¹⁷⁷

Tabla 8. Efecto neuroprotector de los derivados 1–20 frente a la hiperfosforilación de la proteína tau inducida por AO en células SH-SY5Y. Tras 24 h de preincubación de los compuestos, las células SH-SY5Y se incubaron con AO 20 nM y los compuestos durante 20 h. Los compuestos se administraron a 1 μ M y la memantina a 10 nM. La viabilidad celular se midió por el método de la reducción del MTT y el % de protección se calculó según lo descrito en el apartado *Materiales y métodos*.

Compuesto	% Protección	Compuesto	% Protección
Memantina	60 \pm 2 ***	11	81 \pm 6 **
1	84 \pm 2 ***	12	69 \pm 5 **
2	85 \pm 4 ***	13	7 \pm 4 n.s.
3	80 \pm 4 ***	14	58 \pm 2 ***
4	73 \pm 2 ***	15	64 \pm 3 ***
5	52 \pm 6 *	16	78 \pm 2 ***
6	82 \pm 3 ***	17	66 \pm 2 ***
7	72 \pm 5 **	18	60 \pm 4 ***
8	50 \pm 1 ***	19	56 \pm 2 ***
9	72 \pm 5 **	20	70 \pm 3 ***
10	73 \pm 6 *		

Los datos se expresan como la media \pm SEM de al menos 5 experimentos independientes. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ y n.s. = no significativo, respecto a las células tratadas con el AO.

Todos los compuestos ensayados, a excepción de **13**, mostraron valores de neuroprotección frente al AO estadísticamente significativos, superando en muchos casos el valor de protección alcanzado con el control memantina (en 14 compuestos, el valor de protección es superior al 60 %). Todos los compuestos que mostraron capacidad para mantener la actividad Ser/Thr fosfatasa ejercieron un efecto neuroprotector en este modelo de hiperfosforilación de tau. Por tanto, era previsible que el compuesto **13**, que no mostraba capacidad recuperadora de la actividad Ser/Thr fosfatasa, careciera de efecto neuroprotector frente a AO. No obstante, los compuestos **11** y **12**,

que no mostraron actividad recuperadora de PP2A, según los experimentos de actividad fosfatasa empleando citostatina, sí que fueron capaces de disminuir la mortalidad inducida por AO, lo que nos induce a pensar que otros mecanismos de acción podrían estar contribuyendo. También es interesante resaltar que los compuestos estudiados por modelado molecular (**1**, **9**, **14** y **20**) ofrecían resultados de protección satisfactorios en este modelo, como se observa en la Figura 53.

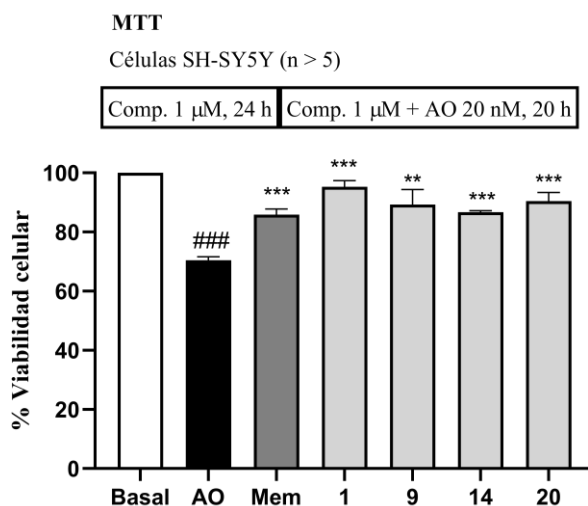


Figura 53. Representación gráfica de la actividad neuroprotectora de compuestos seleccionados en el modelo de hiperfosforilación de tau inducido por AO. Los datos se expresan como la media \pm SEM de al menos 5 experimentos, normalizados frente a la viabilidad celular en ausencia de los compuestos. Los compuestos se evaluaron a 1 μ M y la memantina (Mem) a 10 nM. ### $p < 0,001$, respecto a las células sin tratar (Basal); *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, respecto a las células tratadas solo con AO.

El efeto beneficioso del FTY720 no solo ha sido evaluado en el contexto del cáncer, sino también en el de la EA, tanto por su papel activador de PP2A como por su capacidad para atravesar la BHE. Se ha observado que este fármaco disminuye la producción de β A en cultivo de neuronas. Por otro lado, el tratamiento de ratones transgénicos que sobreexpresaban APP con FTY720 durante 6 días dio como resultado una disminución cerebral de los niveles de β A40, pero un aumento en los de β A42.²⁹² Como se ha comentado en la *Introducción*, el FTY720 y otros PADs ejercen su acción neuroprotectora a través de una activación indirecta de PP2A. Los compuestos **1–20** (a excepción del **13**) ofrecen neuroprotección frente a la hiperfosforilación de tau inducida por AO, hipotéticamente, a través de una activación directa de PP2A resultante de la competición con los inhibidores endógenos de la enzima por su unión a la misma.

En la literatura, no existen datos claros relativos al efecto de citostatina sobre la viabilidad neuronal que pudieran ser utilizados para correlacionar su efecto inhibitor de PP2A con la hiperfosforilación de tau y el consiguiente daño neurodegenerativo. En nuestro estudio, la exposición de las células SH-SY5Y a citostatina (2,5 μ M) redujo la viabilidad celular un 35 % y la mayoría de los compuestos ensayados mitigaron parcialmente dicho daño, según queda reflejado en la Tabla 9. Es de destacar que el compuesto **9** es el que mejor protege frente al daño

provocado por citostatina al superar incluso el efecto neuroprotector de memantina.

Tabla 9. Efecto neuroprotector de los derivados 1–20 frente a la muerte celular inducida por citostatina en células SH-SY5Y. Tras 24 h de preincubación de los compuestos, las células SH-SY5Y se incubaron con citostatina 2,5 μ M y los compuestos durante 20 h. Los compuestos se administraron a 1 μ M y la memantina a 10 nM. La viabilidad celular se midió por el método de la reducción del MTT y el % de protección se calculó según lo descrito en el apartado *Materiales y métodos*.

Compuesto	% Protección	Compuesto	% Protección
Memantina	$57 \pm 5^{**}$	11	$45 \pm 5^*$
1	$47 \pm 4^{**}$	12	$37 \pm 3^*$
2	$45 \pm 5^*$	13	$1 \pm 3^{n.s.}$
3	$49 \pm 5^*$	14	$37 \pm 5^*$
4	$54 \pm 5^{**}$	15	$24 \pm 1^*$
5	$19 \pm 7^{n.s.}$	16	$44 \pm 8^*$
6	$51 \pm 7^*$	17	$26 \pm 4^*$
7	$47 \pm 5^*$	18	$46 \pm 7^*$
8	$50 \pm 5^*$	19	$26 \pm 3^*$
9	$64 \pm 5^{**}$	20	$30 \pm 4^*$
10	$56 \pm 6^*$		

Los datos se expresan como la media \pm SEM de al menos 5 experimentos independientes. $^{**} p < 0,01$, $^* p < 0,05$ y n.s. = no significativo, respecto a las células tratadas con citostatina.

Con los datos mostrados utilizando dos modelos experimentales relacionados con la inhibición de PP2A, hemos conseguido demostrar el efecto neuroprotector de los análogos del fragmento central de AO sintetizados. A continuación, nos preguntamos si el perfil neuroprotector de esta familia de compuestos se sostendría frente a un modelo experimental que no cursara directamente con la inhibición de la actividad fosfatasa, a pesar de que conviene tener presente que todos los mecanismos fisiopatológicos implicados en neurodegeneración presentan un alto grado de correlación con el nivel de actividad de las fosfatasas, especialmente de PP2A.

5.5. Modelo de estrés oxidativo inducido por rotenona/oligomicina A en células SH-SY5Y

Como se ha mencionado en la *Introducción*, el estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial juegan un papel muy relevante en la etiopatogenia de la EA, así como en el conjunto de otras enfermedades neurodegenerativas. Dado que el estrés oxidativo produce la inactivación de fosfatasas como PP2A, sería interesante evaluar si los compuestos sintetizados podrían producir

neuroprotección al interferir con el estrés oxidativo y, de esta manera, reactivar la actividad de PP2A.¹⁴⁴

La exposición de las células SH-SY5Y al cóctel tóxico formado por rotenona y oligomicina A (R/O, 30 y 10 μ M respectivamente) durante 24 h constituye un buen modelo de estrés oxidativo de origen mitocondrial.²⁹³ El cóctel R/O provoca el bloqueo del complejo I y V, respectivamente, de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, lo cual genera especies reactivas de oxígeno y el bloqueo de la síntesis de ATP. En este modelo de estrés oxidativo, la melatonina, administrada a 30 nM, constituye un excelente control positivo gracias a su reconocido perfil antioxidante.²⁹³

Los resultados de esta Tesis, empleando el anterior modelo de estrés oxidativo, muestran que el cóctel R/O redujo la viabilidad de las células SH-SY5Y en un 40 %, lo que ofrece un amplio margen de muerte celular para poder evaluar la actividad neuroprotectora de los compuestos. En la Tabla 10 se puede observar como algo más de la mitad de los derivados del fragmento central de AO **1–20** son capaces de proteger frente a la muerte celular ocasionada por R/O, sobresaliendo por encima de los demás el compuesto **8** y, en menor medida, su predecesor sintético, el compuesto **2**, así como el compuesto final **20**, los cuales alcanzan valores de protección ligeramente superiores a los de la melatonina (28 %).

Tabla 10. Efecto neuroprotector de los derivados de AO frente al estrés oxidativo inducido por R/O en células SH-SY5Y. Tras 24 h de preincubación de los compuestos, las células SH-SY5Y se coincubaron con R/O, 30 y 10 μ M respectivamente. y los compuestos durante 20 h. Los compuestos se administraron a 1 μ M y la melatonina a 30 nM. La viabilidad celular se midió por el método de la reducción del MTT y el % de protección se calculó como se ha explicado en el apartado *Materiales y métodos*.

Compuesto	% Protección	Compuesto	% Protección
Melatonina	28 \pm 2 ***	11	5 \pm 3 n.s.
1	23 \pm 4 *	12	15 \pm 5 n.s.
2	30 \pm 5 *	13	3 \pm 4 n.s.
3	26 \pm 2 **	14	28 \pm 3 *
4	27 \pm 2 **	15	19 \pm 2 *
5	20 \pm 6 n.s.	16	12 \pm 3 n.s.
6	29 \pm 6 *	17	10 \pm 2 n.s.
7	7 \pm 1 n.s.	18	9 \pm 1 n.s.
8	63 \pm 3 ***	19	2 \pm 3 n.s.
9	15 \pm 2 *	20	32 \pm 3 ***
10	23 \pm 2 **		

Los datos se expresan como la media \pm SEM de al menos 5 experimentos independientes. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ y n.s. = no significativo respecto a las células tratadas con R/O.

Aunque es arriesgado extraer conclusiones relativas a la relación estructura-actividad a partir de los datos obtenidos de estos experimentos, se pueden observar ciertos patrones en los compuestos que no ofrecen neuroprotección. Los compuestos muy voluminosos, como el **7** o el **12** (por la presencia del grupo benzoilo) o los compuestos **17**, **18** y **19** (que presentan el grupo TBS) carecen de capacidad antioxidante. Si bien el mantenimiento del potencial redox celular no es la diana biológica sobre la que actúan estos compuestos, es importante señalar que el aumento del estrés oxidativo es capaz de disminuir la actividad fosfatasa de PP2A en células SH-SY5Y²⁹⁴ y, recíprocamente, PP2A regula la desfosforilación de sustratos proteicos que intervienen en el estado redox celular. Además, se ha comprobado que la rotenona disminuye la actividad fosfatasa de PP2A por fosforilación de la Tyr307 en PP2Ac. Se ha descrito que la preincubación de un activador de fosfatasas como la ceramida previene la pérdida de actividad de PP2A inducida por la exposición a rotenona en células de neuroblastoma SK-N-SH.²⁹⁵ Esto podría explicar por qué los compuestos que no actúan sobre fosfatasas, como el compuesto **13**, o los que parece que no tienen actividad sobre PP2A, como los derivados **11** y **12**, tampoco sean capaces de proteger frente al daño originado por R/O. El hecho de que el compuesto **5** no mitigue el daño producido por R/O, pero sí que lo haga su epímero (el compuesto **4**), induce a pensar que los posibles efectos antioxidantes de los nuevos compuestos se producen al actuar sobre dianas biológicas y no por un mero efecto secuestrador de radicales libres. Igualmente, un efecto secuestrador de radicales no explicaría el gran efecto neuroprotector del compuesto **8** frente al producido por el compuesto **3**.

A partir de los datos obtenidos con el ensayo de los compuestos en los distintos modelos experimentales de EA, no se puede establecer una clara correlación entre el efecto neuroprotector frente a la hiperfosforilación de tau y la prevención del estrés oxidativo mitocondrial. Esta falta de correlación puede ser atribuida a la complejidad de la EA que, al igual que otras muchas enfermedades neurodegenerativas, tiene una etiopatogenia multifactorial. En cualquier caso, estos experimentos ayudan a la selección de futuros candidatos para estudios farmacológicos más complejos. A modo de ejemplo, el potencial antioxidante de la melatonina ha sido extensamente estudiado.²⁹³ Menos conocido resulta el hecho de que en un modelo *in vivo* de hiperfosforilación de tau inducido por caliculina A, un inhibidor específico de PP2A y PP1, la administración de melatonina por vía intraperitoneal durante 9 días consecutivos antes de la inyección del tóxico previene los déficits de memoria, así como la hiperfosforilación de tau y de neurofilamentos. Además, la melatonina revirtió parcialmente la fosforilación de PP2Ac en la Tyr307.²⁹⁶ Ya se ha argumentado que la melatonina ejerce un perfil neuroprotector a través de la inhibición de la regulación negativa de la expresión de la subunidad B α , que se encuentra disminuida en modelos *in vivo* de isquemia cerebral en rata y en modelos *in vitro* de excitotoxicidad inducida por glutamato.¹⁸⁰ Estos resultados sugieren que la melatonina podría ejercer sus propiedades

neuroprotectoras también a través de la modulación de la actividad de PP2A. El perfil neuroprotector que muestran más de la mitad de los compuestos sintetizados en esta Tesis en el modelo de estrés oxidativo aporta una interesante propiedad farmacológica para postular a estos compuestos como candidatos terapéuticos en el contexto de enfermedades neurodegenerativas.

5.6. Modelo de excitotoxicidad inducido por glutamato en cultivo primario de neuronas de embrión de rata

La desregulación glutamatérgica juega un papel esencial en la etiopatogenia de la EA. Se ha descrito la existencia de una excitotoxicidad crónica inducida por glutamato en la EA, la cual puede ser ocasionada por distintos factores, como la sensibilización de los receptores de NMDA, una disminución en la capacidad de recaptación de L-glutamato y L-aspartato o un aumento de la liberación de glutamato a través del intercambiador cistina-glutamato.⁹⁵ La muerte por excitotoxicidad es el resultado de una excesiva activación de los receptores de glutamato, que conduce a la pérdida de estructuras postsinápticas, como las dendritas y los somas neuronales.⁹⁵ En resumen, el incremento de L-glutamato extracelular *in vivo* puede afectar a la supervivencia de las células nerviosas y a la función cerebral. Los anteriores efectos deletéreos cerebrales parecen ser altamente dependientes del grado de aumento de L-glutamato, pero incluso un aumento del 10 % es suficiente para afectar la estructura de las células nerviosas y la supervivencia, particularmente en el contexto del envejecimiento. Este hallazgo sugiere que la excitotoxicidad crónica puede ser particularmente relevante en las enfermedades neurodegenerativas relacionadas con la edad. La memantina, antagonista de los receptores de NMDA, en monoterapia o como coadyuvante de los anticolinesterásicos, tiene un cierto efecto paliativo del deterioro cognitivo.⁹⁴

Puesto que las células de neuroblastoma humano SH-SY5Y carecen de receptores de NMDA funcionales,²⁹⁷ para el estudio de excitotoxicidad inducido por glutamato se utilizó el cultivo primario de neuronas de corteza de embrión de rata, de acuerdo al protocolo descrito por Deering y col..²⁹⁸ Como fármaco de referencia se empleó memantina. Como se puede observar en la Tabla 11, 12 de los compuestos evaluados fueron capaces de proteger frente a la pérdida de viabilidad celular inducida por la excitotoxicidad mediada por glutamato. Destacan compuestos como el **1**, **5**, **9**, **14** o **20**, con valores de protección iguales o superiores al proporcionado por el fármaco control memantina (22 %).

Tabla 11. Efecto neuroprotector de los derivados **1–20** frente a la excitotoxicidad inducida por glutamato en neuronas corticales de embrión de rata. Tras 24 h de preincubación de los compuestos en las neuronas corticales de embrión de rata, se incorporó glutamato 50 μ M. Los compuestos se administraron a 1 μ M y la memantina a 10 nM. La viabilidad celular se midió por el método del MTT y el % de protección se calculó según se ha explicado en el apartado *Materiales y métodos*.

Compuesto	% Protección	Compuesto	% Protección
Memantina	$22 \pm 2^{**}$	11	$5 \pm 2^{n.s.}$
1	$19 \pm 2^{**}$	12	$17 \pm 3^*$
2	$15 \pm 2^*$	13	$17 \pm 3^*$
3	$15 \pm 3^*$	14	$24 \pm 3^{**}$
4	$13 \pm 1^*$	15	$14 \pm 5^*$
5	$29 \pm 6^*$	16	$1 \pm 4^{n.s.}$
6	$12 \pm 3^{n.s.}$	17	$13 \pm 4^{n.s.}$
7	$8 \pm 2^{n.s.}$	18	$2 \pm 7^{n.s.}$
8	$9 \pm 4^{n.s.}$	19	$11 \pm 3^{n.s.}$
9	$20 \pm 4^*$	20	$39 \pm 6^{**}$
10	$14 \pm 1^*$		

Los datos se expresan como la media \pm SEM de al menos 5 experimentos independientes. $^{**} p < 0,01$, $^* p < 0,05$ y n.s. = no significativo respecto a las células tratadas con glutamato.

Si bien no puede inferirse una relación estructura-actividad de los anteriores resultados, es importante resaltar que gran parte de los compuestos sintetizados actúan como protectores en este modelo de neurodegeneración por excitotoxicidad, a pesar de que los compuestos no habían sido diseñados para actuar a este nivel. Este interesante perfil neuroprotector de los compuestos se puede atribuir a la íntima relación existente entre PP2A y los receptores de NMDA. Así, en el SNC, se ha descrito que PP2A forma un complejo estable con la subunidad NR3A del receptor de NMDA. Esta asociación aumenta la actividad enzimática fosfatasa de PP2A y la desfosforilación de la subunidad NR1, la cual produce un efecto desensibilizante del receptor. La estimulación del receptor NMDA por glutamato provoca la disociación de PP2A del complejo con NR3A y, consecuentemente, conduce a una disminución de la actividad fosfatasa.²⁹⁹ Dicha pérdida de actividad podría verse parcialmente restituida por la acción de algunos de los derivados del fragmento central de AO descritos en esta Memoria. Sin embargo, algunos autores señalan que la subunidad NR3A se encuentra regulada a la baja en adultos y que, por tanto, la estimulación del receptor en cerebro de adultos podría no tener un efecto significativo sobre la actividad de PP2A.¹⁷⁷

En este punto del estudio, es interesante resaltar que la mayoría de los compuestos **1–20** evaluados muestran valores de neuroprotección estadísticamente significativos en casi todos los modelos de neurodegeneración utilizados (Tabla 12). Con objeto de estudiar en mayor detalle el mecanismo por el que los anteriores compuestos producen el efecto neuroprotector, se escogió el derivado de AO que presentaba un perfil más equilibrado de las propiedades farmacológicas estudiadas, en base a los hallazgos de los experimentos de neuroprotección y de actividad fosfatasa, y que además poseía propiedades farmacocinéticas óptimas, de acuerdo a los criterios de Lipinski y de *drug-likeness*. A pesar de que el candidato ideal para profundizar en su estudio sería el compuesto final **20**, la complejidad de su síntesis retrasó mucho su obtención en el transcurso del trabajo detallado en esta Memoria, por lo que, eventualmente, se escogió el compuesto **9** que presenta excelentes propiedades neuroprotectoras, afinidad por PP2A en base a los estudios de *docking* molecular, adecuado perfil farmacocinético y fácil síntesis.

5.7. Efecto del compuesto 9 sobre la expresión proteica

El tratamiento de células de neuroblastoma SH-SY5Y con AO (20 nM) durante 20 h, como se ha comentado previamente, proporciona un buen modelo para simular la neurodegeneración observada en la EA, ya que conduce a la hiperfosforilación de la proteína tau y, en último término, a la muerte neuronal. Más allá de estudiar el efecto de los compuestos sobre la pérdida de viabilidad celular por el método de la reducción del MTT, también es interesante cuantificar la expresión de la proteína tau hiperfosforilada en esta situación, para confirmar si el compuesto seleccionado era capaz de prevenir dicha hiperfosforilación. El compuesto **9** fue finalmente seleccionado para realizar estos experimentos de *immunoblot*, no solo por su capacidad de recuperar la actividad fosfatasa de PP2A comprometida, sino porque además mostró un buen perfil en los tres modelos de neuroprotección desarrollados en esta Tesis.

Para determinar el nivel de expresión de la proteína tau hiperfosforilada (p-tau), se utilizó el anticuerpo primario anti-fosfotau AT8, capaz de reconocer los fosfoepítomos *p*Ser202 y *p*Thr205, característicos de la proteína tau que conforma los ovillos neurofibrilares.³⁰⁰ Por otra parte, ambos aminoácidos son esenciales para la agregación de tau en pacientes con EA y son eficientemente desfosforilados por PP2A.³⁰¹ Los resultados mostrados en la Figura 54 indican que el compuesto **9** a 0,1 μ M era capaz de prevenir la hiperfosforilación de tau inducida por AO de forma precisa, incluso a nivel comparable a como lo hace el fármaco de referencia, memantina.

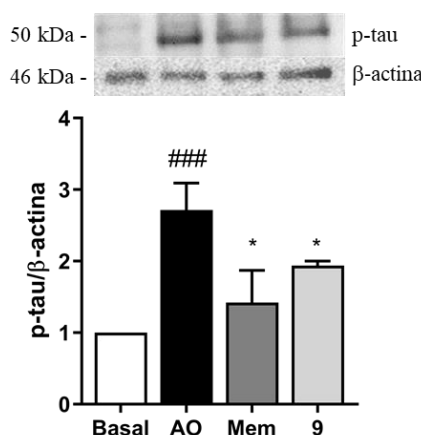


Figura 54. Análisis de la expresión proteica de p-tau (Ser202, Thr205) en células SH-SY5Y. Tras 24 h de preincubación con el compuesto **9** a 0,1 μ M o memantina a 10 nM, las células se preincubaron con AO 20 nM y **9** o memantina durante 20 h. (Superior) *Immunoblot* de un experimento representativo. (Inferior) Análisis cuantitativo de la hiperfosforilación de tau. Las barras representan la media \pm SEM de al menos 4 experimentos independientes. ### $p < 0,001$, respecto a las células sin tratar (Basal); * $p < 0,05$, respecto a las células tratadas solo con el AO.

Por otro lado, la cinasa GSK-3 β es otra fosfoproteína sustrato de PP2A estrechamente relacionada con la EA. En cuanto a su regulación, la fosforilación de GSK-3 β en la Ser9 por diversas cinasas como Akt, PKC o ERK, disminuye su actividad, mientras que la desfosforilación del mismo residuo por PP2A (pero no por PP1) resulta en un aumento de su actividad.³⁰²

El AO, debido a su papel inhibitorio de PP2A, produce un aumento en la fosforilación de GSK-3 β (en la Ser9) y, por tanto, ocasiona una disminución en su actividad. Así pues, utilizando células SH-SY5Y expuestas a AO para inducir la fosforilación de GSK-3 β , se diseñaron experimentos de *immunoblot* para evaluar si el compuesto **9**, a través de la reactivación de PP2A, podría regular a la baja la expresión de p-GSK-3 β .

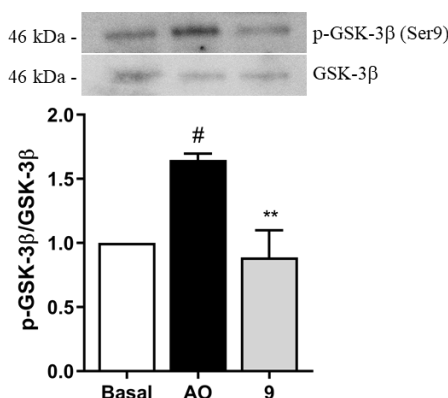


Figura 55. Análisis de la expresión proteica de p-GSK-3 β (Ser9) en células SH-SY5Y. Tras 24 h de preincubación con el compuesto **9** a 0,1 μ M, las células se preincubaron con el AO 20 nM y los compuestos durante 20 h. (Superior) *Immunoblot* de un experimento representativo. (Inferior) Análisis cuantitativo de la hiperfosforilación de GSK-3 β . Las barras representan la media \pm SEM de al menos 4 experimentos independientes. # $p < 0,05$, respecto a las células sin tratar (Basal); ** $p < 0,01$, respecto a las células tratadas solo con el AO.

Para determinar la expresión de la proteína GSK-3 β fosforilada, se utilizó el anticuerpo primario anti-p-GSK-3 β capaz de reconocer el fosfoepítipo pSer9 de la anterior cinasa. Los resultados de la cuantificación de la expresión proteica (Figura 55) revelan que el compuesto **9** reduce la fosforilación en la Ser9 de GSK-3 β , gracias a su actividad sobre PP2A. Podría resultar contradictorio que el compuesto **9** aumente la forma activa de la principal cinasa que fosforila tau. Sin embargo, varios estudios han demostrado claramente que GSK-3 β y PP2A están reguladas entre sí. GSK-3 β promueve la metilación de PP2Ac (forma activa), ya que: 1) disminuye la expresión de PME-1, que inactiva PP2A tanto desmetilando la forma activa, como actuando como inhibidor directo, y 2) fosforila LCMT-1, lo que resulta en un aumento de la actividad de PP2A hacia tau. Es decir, PP2A es activada por GSK-3 β .³⁰³ Por otro lado, la fosforilación de tau es un proceso muy complejo, puesto que su desfosforilación por PP2A y fosforilación por GSK-3 β se catalizan de una manera específica dependiendo de los aminoácidos implicados.^{121, 304} PP2A desfosforila tau con un orden de preferencia definido por la secuencia Ser262/356 = Thr205 > Ser214 > Ser396 > Ser199.¹²¹ Por su parte, GSK-3 β es más activa en la fosforilación de tau en Ser199, Thr205 y Ser396, pero no en Ser214 y Ser262/356.³⁰⁴ La disminución de la actividad de PP2A en la EA y, en consecuencia, la disminución de la actividad de GSK-3 β , puede causar un aumento dramático en la hiperfosforilación de tau en sitios sensibles a PP2A e insensibles a GSK-3 β , como Ser262/356 y Thr205, pero no tanto en los sitios más favorables de GSK-3 β e insensibles a PP2A, tales como Ser396 y Ser199.³⁰³ En resumen, GSK-3 β y PP2A se regulan entre sí y regulan la fosforilación de tau directa e indirectamente a través de la modulación de cada uno. Aunque el compuesto **9** aumente la forma activa de GSK-3 β a través de la activación de PP2A, el balance resultante lleva a una disminución en la fosforilación de tau, concretamente en los residuos Ser202/Thr205, involucrados directamente en la patología tau.

Con el fin de profundizar un poco más en el estudio del compuesto **9**, se analizó su efecto sobre la actividad de la isoforma de PP2A implicada en la desfosforilación de la proteína tau, PP2A-B α , y sobre la isoforma B' α , que participa en la desfosforilación e inactivación de ERK1/2, responsable también de la fosforilación de la proteína tau.²⁵⁸ Para ello, siguiendo el procedimiento descrito en *Materiales y métodos*, se transfectaron las células HEK 293T con la subunidad B α o B' α y se procedió a la inmunoprecipitación de la isoforma de PP2A deseada y la medida de su actividad fosfatasa por el método de verde malaquita.

Los resultados muestran que el compuesto **9** fue capaz de revertir la pérdida de actividad fosfatasa de PP2A-B α y PP2A-B' α inducida por AO (Figura 56).

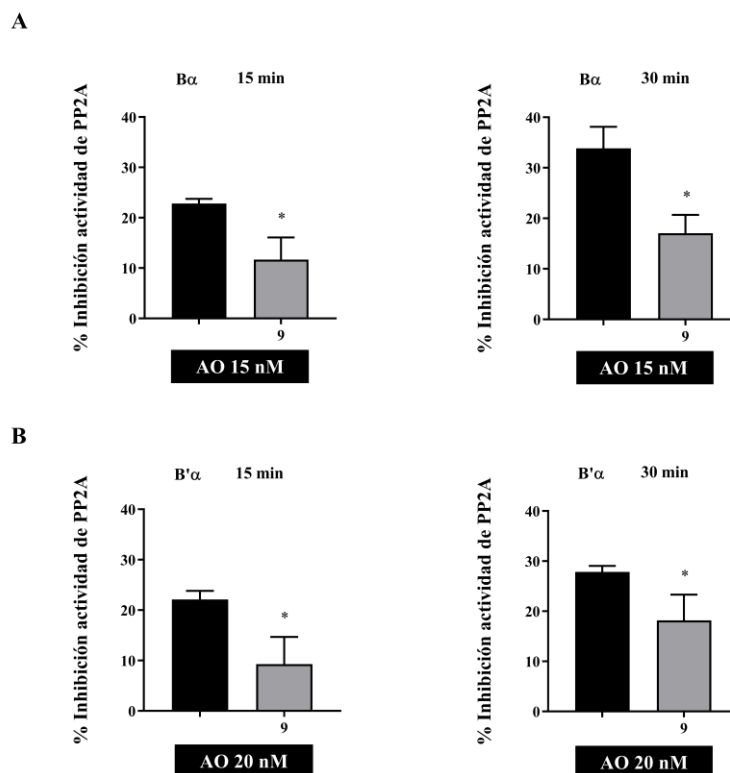


Figura 56. Actividad fosfatasa de PP2A medida por el método de verde malaquita utilizando el fosfopéptido K-R-pT-I-R-R. Las isoformas PP2A-B α y PP2A-B' α fueron purificadas mediante el método de *pull-down* a partir de células HEK 293T transfectadas con GFP-B55 α (B α) o GFP-B56 α (B' α), usando GFP como proteína cebo. Los constructos de PP2A fueron tratados con AO 20 nM y el compuesto **9** a 1 μ M. El fosfopéptido fue hidrolizado durante 15 y 30 min por PP2A-B α (A) y PP2A-B' α (B). Los datos representan el porcentaje de inhibición de PP2A, normalizados frente a la actividad de los precipitados tratados solo con vehículo (100 % actividad). Los datos se expresan como la media \pm SEM de al menos 4 experimentos independientes. * $p < 0,5$.

5.8. Discusión general

A pesar del relevante papel que desempeña la proteína fosfatasa PP2A en la EA, el abordaje de la actividad Ser/Thr fosfatasa como diana terapéutica apenas ha sido estudiado. Aunque la alteración de los procesos de fosforilación de proteínas subyace en numerosos procesos patológicos, la mayoría de los esfuerzos realizados en la búsqueda de nuevos fármacos se han centrado en el desarrollo de inhibidores de cinasas. Este menor interés por las fosfatasas puede ser debido a diversas causas. En primer lugar, las fosfatasas poseen una mayor complejidad y diversidad ya que han evolucionado a partir de distintos ancestros, mientras que las cinasas lo hicieron a partir de un ancestro común. Existen, además, un menor número de genes que codifican para fosfatasas que cinasas. En segundo lugar, la diferente y compleja regulación de las diversas familias de fosfatasas añade un grado de dificultad a su estudio. Por otro lado, el descubrimiento de ligandos selectivos para fosfatasas es tremendamente complicado, además de ser aún mayor la

complejidad de diseñar activadores en lugar de inhibidores dado que los primeros tienen que ser capaces de interaccionar con la diana sin bloquear su acción enzimática.

Centrándonos en la EA, puesto que la Ser262/356 es diana de PP2A pero no de GSK-3 β , y dado que su fosforilación es requerida para la patología tau,^{301, 305} diversos autores defienden la intervención terapéutica sobre la proteína PP2A en detrimento de GSK-3 β ³⁰³ ya que, cualquier reducción en la fosforilación de tau por inhibición de GSK-3 β será más que compensada por la reducción en la actividad PP2A resultante de la regulación cruzada entre las vías PP2A y PI3K-Akt-GSK-3 β , sin tener en cuenta, además, que otras cinasas podrían compensar la inhibición de actividad de GSK-3 β .

Los efectos de PP2A sobre las cinasas de tau no se limitan a GSK-3 β , ya que se ha descrito que esta fosfatasa regula negativamente la actividad de otras de estas cinasas. Así, PP2A actúa como un interruptor de apagado de la actividad de varias proteínas cinasas, incluida la proteína cinasa C (PKC), Akt o ERK.³⁰⁶ En este sentido, se ha demostrado que la inhibición crónica de PP2A conduce a la activación de ERK y JNK, lo que también conduce a la hiperfosforilación de la proteína tau.³⁰⁷ Además, la expresión de las anteriores cinasas se encuentra aumentada en pacientes con EA.³⁰⁸

En este contexto, aquellos derivados del fragmento central de AO evaluados en esta Tesis Doctoral que muestran capacidad para reactivar la actividad Ser/Thr fosfatasa comprometida por la presencia de un inhibidor selectivo como el AO o la citostatina, presentan a su vez, en la mayoría de los casos, un buen perfil neuroprotector que contrarresta el daño neuronal provocado por la hiperfosforilación de la proteína tau, el estrés oxidativo o la excitotoxicidad, tal como se recoge en la Tabla 12.

Tabla 12. Resumen de los efectos de los compuestos **1-20** sobre la actividad Ser/Thr fosfatasa y los modelos *in vitro* de neurodegeneración estudiados. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ y n.s. = no significativo.

	Actividad fosfatasa (AO)	Actividad fosfatasa (Citostatina)	Neuroprotección hiperfosforilación de tau (AO)	Neuroprotección estrés oxidativo (R/O A)	Neuroprotección excitotoxicidad (Glutamato)
1	***	*	***	*	**
2	***	***	***	*	*
3	***	*	***	**	*
4	***	**	***	**	*
5	***	**	*	n.s.	*
6	***	*	***	*	n.s.
7	***	*	**	n.s.	n.s.
8	***	*	***	***	n.s.
9	***	**	**	*	*
10	***	*	*	**	*
11	***	n.s.	**	n.s.	n.s.
12	***	n.s.	**	n.s.	*
13	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*
14	***	***	***	*	**
15	*	***	***	*	*
16	***	***	***	n.s.	n.s.
17	***	***	***	n.s.	n.s.
18	***	***	***	n.s.	n.s.
19	***	***	***	n.s.	n.s.
20	***	***	***	***	**

El compuesto **9**, en línea con la afinidad que mostraba por PP2A en los experimentos de *docking* molecular, ha demostrado ser capaz de recuperar parcialmente la actividad Ser/Thr fosfatasa comprometida por el AO o la citostatina. Este efecto podría explicar la neuroprotección ejercida por el compuesto en diversos modelos que remedan características fisiopatológicas de la EA. Además, su sencilla síntesis y sus adecuadas características farmacocinéticas que hacen presuponer su paso por BHE, lo postulan como un buen candidato en la búsqueda de una nueva terapia para la EA (Figura 57). En este sentido, los ensayos clínicos dirigidos a la terapia anti-tau están cobrando especial relevancia en detrimento de los dirigidos a la β A. El número de ensayos de fase III de fármacos antiamiloidogénicos se ha visto reducido significativamente en 2019. Los objetivos de los ensayos de fase I y II son diversos y las tendencias muestran una mayor

focalización en la neuroprotección y la antineuroinflamación en ensayos de fase I y de fase II, respectivamente.¹²⁸ Centrándonos en la estrategia anti-tau, tras superar la fase IIa,²⁸⁷ pacientes con EA leve y moderada han sido reclutados para evaluar la respuesta clínica y la eficacia del selenato de sodio, un compuesto inorgánico que aumenta la actividad de PP2A *in vitro*, reduce la patología fosfo-tau, mejora el aprendizaje espacial y la memoria, y mitiga los déficits motores en la taupatía transgénica en modelos de ratón. Sin embargo, su mecanismo exacto de acción y especificidad hacia la enzima PP2A no se ha demostrado con exactitud. Estudios *in vivo* deberían llevarse a cabo con el compuesto **9** u otros compuestos de los descritos en esta Memoria para comparar su acción con la del selenato sódico.

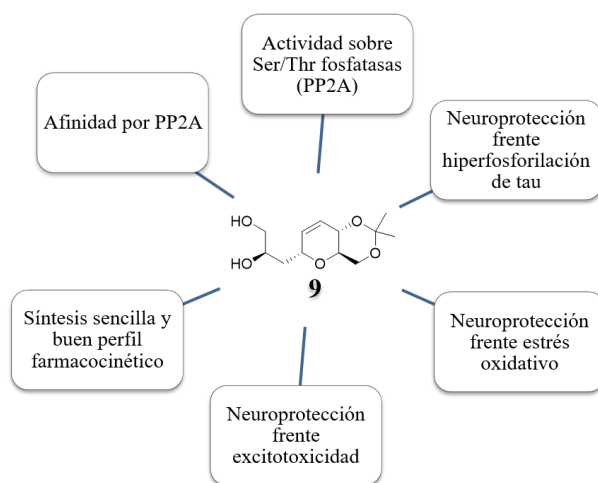


Figura 57. Resumen de las principales propiedades del compuesto **9**.

Por su parte, el compuesto **20** ofrece propiedades neuroprotectoras muy interesantes, además de presentarse como un excelente activador de PP2A. No obstante, su tardía obtención a lo largo de esta Tesis nos impidió llevar a cabo estudios más profundos con él, similares a los realizados con el compuesto **9**. Además, datos preliminares con el compuesto **14** parecen indicar que estos compuestos podrían, no solo competir con los inhibidores endógenos de PP2A (como PME-1, altamente expresado en la EA) por su unión con PP2Ac, sino que también podrían favorecer la disociación del complejo PP2Ac–PME-1. En base a estos hallazgos aún incipientes y poco contrastados, se hace necesaria la realización de experimentos adicionales que permitan identificar nuevos mecanismos de acción de los compuestos sintetizados, así como profundizar en el estudio del compuesto **20**.

5.9. Conclusiones parciales

- Los análogos del fragmento C19–C27 de AO estudiados mediante la técnica de *docking* molecular son capaces de establecer interacciones con los aminoácidos que forman parte del bolsillo hidrofóbico de la subunidad catalítica de PP2A.
- Los derivados sintetizados no presentan toxicidad en la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y o en cultivos primarios de neuronas corticales de embrión de rata, a excepción del compuesto **18**.
- La recuperación parcial de la actividad fosfatasa de PP2A ejercida por los compuestos en células SH-SY5Y provoca una disminución tanto de la mortalidad como de la hiperfosforilación de la proteína tau inducidas por AO.
- Algunos de los compuestos presentan cierta capacidad antioxidante en el modelo de estrés oxidativo inducido por R/O en células SH-SY5Y.
- Algunos compuestos muestran un efecto neuroprotector en el modelo de excitotoxicidad inducida por glutamato en neuronas corticales de embrión de rata.
- El compuesto **9**, por su perfil neuroprotector, activador de PP2A y regulador del estado de fosforilación de tau, se posiciona como un prometedor candidato para ser evaluado en modelos *in vivo* de neurodegeneración que tengan su origen en una taupatía.

CONCLUSIONES/CONCLUSIONS

Las principales **conclusiones** de esta Tesis Doctoral son las siguientes:

1. La toxina natural AO es un buen punto de partida para la búsqueda de nuevas moléculas con capacidad moduladora de la enzima Ser/Thr fosfatasa PP2A.
2. Se han sintetizado un total de 20 compuestos análogos del fragmento C19–C27 de AO, en condiciones suaves y con buenos rendimientos en la mayoría de los casos. La optimización de las reacciones químicas ha permitido la obtención del compuesto final **20** en 11 pasos de reacción y con un rendimiento global del 5 %.
3. Todos los derivados de AO sintetizados cumplen los criterios de Lipinski, por lo que sería factible su administración oral.
4. El compuesto **1** reactivó significativamente la actividad fosfatasa de varias isoformas de PP2A comprometida por AO, según se infiere de los experimentos de verde malaquita.
5. Los datos de citometría de flujo e *immunoblot* en células A549 muestran que el compuesto **1** es capaz de abolir la resistencia a cisplatino inducida por nicotina. El compuesto produce el anterior efecto al restituir la capacidad proapoptótica del cisplatino como consecuencia de la reactivación de PP2A que disminuye la fosforilación de Akt y ERK1/2 y produce una estabilización de la proteína proapoptótica Bax.
6. La mayoría de los compuestos sintetizados son capaces de recuperar la actividad fosfatasa de PP2A comprometida por la presencia del inhibidor AO o citostatina. Los estudios de *docking* molecular confirman la afinidad de los compuestos por la enzima.
7. La actividad de los compuestos sobre PP2A induce una señal protectora en células SH-SY5Y sometidas a diferentes estímulos tóxicos implicados en la etiopatogenia de la EA, como la hiperfosforilación de la proteína tau, el estrés oxidativo o la excitotoxicidad.

En conjunto, nuestros datos sugieren que una intervención encaminada a favorecer la recuperación de la actividad Ser/Thr fosfatasa de PP2A puede ser una buena estrategia terapéutica con potencial indicación en el tratamiento del cáncer de pulmón no microcítico o la EA. Por ello, el diseño de análogos pequeños de AO, como los sintetizados en esta Tesis, constituye un abordaje válido y prometedor para el descubrimiento de nuevos activadores de acción directa sobre PP2A.

The main **conclusions** of this Doctoral Thesis are the following:

1. The natural toxin OA is a good starting point for the search of new molecules with modulating capacity of the Ser/Thr phosphatase enzyme PP2A.
2. A total of 20 analogs of the C19–C27 OA fragment have been synthesized under mild conditions and with high yields in most of the cases. The optimization of the chemical reactions has made possible to obtain the final compound **20** in 11 reaction steps and with an overall yield of 5 %.
3. All the synthesized OA derivatives meet the Lipinski criteria, so their oral administration would be feasible.
4. Compound **1** significantly reactivated the phosphatase activity of different PP2A isoforms compromised by OA, as inferred from the malachite green experiments.
5. Immunoblot and flow cytometry data in A549 cells show that compound **1** is capable of abolishing nicotine-induced resistance to cisplatin. The compound produces the aforementioned effect by restoring the pro-apoptotic capacity of cisplatin as a consequence of the reactivation of PP2A, that decreases the phosphorylation of Akt and ERK1/2 and produces a stabilization of the pro-apoptotic protein Bax.
6. Most of the synthesized compounds can recover the phosphatase activity of PP2A compromised by the presence of the inhibitor OA or cytosstatin. Molecular docking studies confirm the affinity of the compounds for the enzyme.
7. The activity of the compounds on PP2A induces a protective signal in SH-SY5Y cells subjected to different toxic stimuli implicated in the etiopathogenesis of Alzheimer's disease, such as tau protein hyperphosphorylation, oxidative stress or excitotoxicity.

Overall, our data suggest that an intervention aimed to promote the recovery of the Ser/Thr phosphatase activity of PP2A may be a good therapeutic strategy with potential indication in the treatment of non-small cell lung cancer or Alzheimer's disease. Therefore, the design of small OA analogs, such as those synthesized in this Thesis, constitutes a valid and promising approach for the discovery of new activators with direct action on PP2A.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Kurosawa, M., Phosphorylation and dephosphorylation of protein in regulating cellular function. *Journal of pharmacological and toxicological methods* **1994**, *31*, 135-9.
2. Hunter, T., Why nature chose phosphate to modify proteins. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* **2012**, *367*, 2513-6.
3. Schwartz, P. A.; Murray, B. W., Protein kinase biochemistry and drug discovery. *Bioorganic chemistry* **2011**, *39*, 192-210.
4. Nishi, H.; Shaytan, A.; Panchenko, A. R., Physicochemical mechanisms of protein regulation by phosphorylation. *Frontiers in genetics* **2014**, *5*, 270.
5. Zhang, M.; Yogesha, S. D.; Mayfield, J. E.; Gill, G. N.; Zhang, Y., Viewing serine/threonine protein phosphatases through the eyes of drug designers. *The FEBS journal* **2013**, *280*, 4739-60.
6. Ardito, F.; Giuliani, M.; Perrone, D.; Troiano, G.; Lo Muzio, L., The crucial role of protein phosphorylation in cell signaling and its use as targeted therapy (Review). *International journal of molecular medicine* **2017**, *40*, 271-280.
7. Virshup, D. M.; Shenolikar, S., From promiscuity to precision: protein phosphatases get a makeover. *Mol Cell* **2009**, *33*, 537-45.
8. Roskoski, R., Jr., ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacological research* **2012**, *66*, 105-43.
9. Shi, Y., Serine/threonine phosphatases: mechanism through structure. *Cell* **2009**, *139*, 468-84.
10. Egloff, M. P.; Cohen, P. T.; Reinemer, P.; Barford, D., Crystal structure of the catalytic subunit of human protein phosphatase 1 and its complex with tungstate. *Journal of molecular biology* **1995**, *254*, 942-59.
11. Goldberg, J.; Huang, H. B.; Kwon, Y. G.; Greengard, P.; Nairn, A. C.; Kuriyan, J., Three-dimensional structure of the catalytic subunit of protein serine/threonine phosphatase-1. *Nature* **1995**, *376*, 745-53.
12. Bialojan, C.; Takai, A., Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases. Specificity and kinetics. *The Biochemical journal* **1988**, *256*, 283-90.
13. Pereira, S. R.; Vasconcelos, V. M.; Antunes, A., The phosphoprotein phosphatase family of Ser/Thr phosphatases as principal targets of naturally occurring toxins. *Critical reviews in toxicology* **2011**, *41*, 83-110.
14. Oliver, C. J.; Shenolikar, S., Physiologic importance of protein phosphatase inhibitors. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* **1998**, *3*, D961-72.
15. Ceulemans, H.; Bollen, M., Functional diversity of protein phosphatase-1, a cellular economizer and reset button. *Physiological reviews* **2004**, *84*, 1-39.
16. Cohen, P. T., Protein phosphatase 1--targeted in many directions. *Journal of cell science* **2002**, *115*, 241-56.
17. Verbinen, I.; Ferreira, M.; Bollen, M., Correction: Biogenesis and activity regulation of protein phosphatase 1. *Biochemical Society transactions* **2017**, *45*, 583-584.
18. Ferreira, M.; Beullens, M.; Bollen, M.; Van Eynde, A., Functions and therapeutic potential of protein phosphatase 1: Insights from mouse genetics. *Biochimica et biophysica acta. Molecular cell research* **2019**, *1866*, 16-30.

19. Bastan, R.; Eskandari, N.; Sabzghabae, A. M.; Manian, M., Serine/Threonine phosphatases: classification, roles and pharmacological regulation. *International journal of immunopathology and pharmacology* **2014**, *27*, 473-84.
20. Seshacharyulu, P.; Pandey, P.; Datta, K.; Batra, S. K., Phosphatase: PP2A structural importance, regulation and its aberrant expression in cancer. *Cancer letters* **2013**, *335*, 9-18.
21. Janssens, V.; Goris, J., Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *The Biochemical journal* **2001**, *353*, 417-39.
22. Sangodkar, J.; Farrington, C. C.; McClinch, K.; Galsky, M. D.; Kastrinsky, D. B.; Narla, G., All roads lead to PP2A: exploiting the therapeutic potential of this phosphatase. *The FEBS journal* **2016**, *283*, 1004-24.
23. Xing, Y.; Xu, Y.; Chen, Y.; Jeffrey, P. D.; Chao, Y.; Lin, Z.; Li, Z.; Strack, S.; Stock, J. B.; Shi, Y., Structure of protein phosphatase 2A core enzyme bound to tumor-inducing toxins. *Cell* **2006**, *127*, 341-53.
24. Stone, S. R.; Hofsteenge, J.; Hemmings, B. A., Molecular cloning of cDNAs encoding two isoforms of the catalytic subunit of protein phosphatase 2A. *Biochemistry* **1987**, *26*, 7215-20.
25. Khew-Goodall, Y.; Hemmings, B. A., Tissue-specific expression of mRNAs encoding alpha- and beta-catalytic subunits of protein phosphatase 2A. *FEBS letters* **1988**, *238*, 265-8.
26. Eichhorn, P. J.; Creighton, M. P.; Bernards, R., Protein phosphatase 2A regulatory subunits and cancer. *Biochimica et biophysica acta* **2009**, *1795*, 1-15.
27. Janssens, V.; Longin, S.; Goris, J., PP2A holoenzyme assembly: in cauda venenum (the sting is in the tail). *Trends in biochemical sciences* **2008**, *33*, 113-21.
28. Zhao, Y.; Boguslawski, G.; Zitomer, R. S.; DePaoli-Roach, A. A., Saccharomyces cerevisiae homologs of mammalian B and B' subunits of protein phosphatase 2A direct the enzyme to distinct cellular functions. *The Journal of biological chemistry* **1997**, *272*, 8256-62.
29. Cho, U. S.; Xu, W., Crystal structure of a protein phosphatase 2A heterotrimeric holoenzyme. *Nature* **2007**, *445*, 53-7.
30. Sents, W.; Ivanova, E.; Lambrecht, C.; Haesen, D.; Janssens, V., The biogenesis of active protein phosphatase 2A holoenzymes: a tightly regulated process creating phosphatase specificity. *The FEBS journal* **2013**, *280*, 644-61.
31. Kong, M.; Ditsworth, D.; Lindsten, T.; Thompson, C. B., Alpha4 is an essential regulator of PP2A phosphatase activity. *Mol Cell* **2009**, *36*, 51-60.
32. Wu, C. G.; Zheng, A.; Jiang, L.; Rowse, M.; Stanevich, V.; Chen, H.; Li, Y.; Satyshur, K. A.; Johnson, B.; Gu, T. J.; Liu, Z.; Xing, Y., Methylation-regulated decommissioning of multimeric PP2A complexes. *Nature communications* **2017**, *8*, 2272.
33. Smetana, J. H.; Zanchin, N. I., Interaction analysis of the heterotrimer formed by the phosphatase 2A catalytic subunit, alpha4 and the mammalian ortholog of yeast Tip41 (TIPRL). *The FEBS journal* **2007**, *274*, 5891-904.
34. Li, M.; Guo, H.; Damuni, Z., Purification and characterization of two potent heat-stable protein inhibitors of protein phosphatase 2A from bovine kidney. *Biochemistry* **1995**, *34*, 1988-96.
35. Junttila, M. R.; Puustinen, P.; Niemelä, M.; Ahola, R.; Arnold, H.; Böttzauw, T.; Ala-aho, R.; Nielsen, C.; Ivaska, J.; Taya, Y.; Lu, S. L.; Lin, S.; Chan, E. K.; Wang, X. J.; Grønman, R.; Kast, J.; Kallunki, T.; Sears, R.; Kähäri, V. M.; Westermarck, J., CIP2A inhibits PP2A in human malignancies. *Cell* **2007**, *130*, 51-62.

36. Li, M.; Makkinje, A.; Damuni, Z., The myeloid leukemia-associated protein SET is a potent inhibitor of protein phosphatase 2A. *The Journal of biological chemistry* **1996**, *271*, 11059-62.
37. Neviani, P.; Santhanam, R.; Trotta, R.; Notari, M.; Blaser, B. W.; Liu, S.; Mao, H.; Chang, J. S.; Galletta, A.; Uttam, A.; Roy, D. C.; Valtieri, M.; Bruner-Klisovic, R.; Caligiuri, M. A.; Bloomfield, C. D.; Marcucci, G.; Perrotti, D., The tumor suppressor PP2A is functionally inactivated in blast crisis CML through the inhibitory activity of the BCR/ABL-regulated SET protein. *Cancer cell* **2005**, *8*, 355-68.
38. Liu, H.; Gu, Y.; Wang, H.; Yin, J.; Zheng, G.; Zhang, Z.; Lu, M.; Wang, C.; He, Z., Overexpression of PP2A inhibitor SET oncoprotein is associated with tumor progression and poor prognosis in human non-small cell lung cancer. *Oncotarget* **2015**, *6*, 14913-25.
39. Fang, Y.; Li, Z.; Wang, X.; Zhang, S., CIP2A is overexpressed in human ovarian cancer and regulates cell proliferation and apoptosis. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* **2012**, *33*, 2299-306.
40. Teng, H. W.; Yang, S. H.; Lin, J. K.; Chen, W. S.; Lin, T. C.; Jiang, J. K.; Yen, C. C.; Li, A. F.; Chen, P. C.; Lan, Y. T.; Lin, C. C.; Hsu, Y. N.; Wang, H. W.; Chen, K. F., CIP2A is a predictor of poor prognosis in colon cancer. *Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract* **2012**, *16*, 1037-47.
41. Vaarala, M. H.; Väisänen, M. R.; Ristimäki, A., CIP2A expression is increased in prostate cancer. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR* **2010**, *29*, 136.
42. Khanna, A.; Böckelman, C.; Hemmes, A.; Junttila, M. R.; Wiksten, J. P.; Lundin, M.; Junnila, S.; Murphy, D. J.; Evan, G. I.; Haglund, C.; Westermarck, J.; Ristimäki, A., MYC-dependent regulation and prognostic role of CIP2A in gastric cancer. *Journal of the National Cancer Institute* **2009**, *101*, 793-805.
43. Ma, L.; Wen, Z. S.; Liu, Z.; Hu, Z.; Ma, J.; Chen, X. Q.; Liu, Y. Q.; Pu, J. X.; Xiao, W. L.; Sun, H. D.; Zhou, G. B., Overexpression and small molecule-triggered downregulation of CIP2A in lung cancer. *PloS one* **2011**, *6*, e20159.
44. Shentu, Y. P.; Huo, Y.; Feng, X. L.; Gilbert, J.; Zhang, Q.; Liuyang, Z. Y.; Wang, X. L.; Wang, G.; Zhou, H.; Wang, X. C.; Wang, J. Z.; Lu, Y. M.; Westermarck, J.; Man, H. Y.; Liu, R., CIP2A Causes Tau/APP Phosphorylation, Synaptopathy, and Memory Deficits in Alzheimer's Disease. *Cell reports* **2018**, *24*, 713-723.
45. Khanna, A.; Pimanda, J. E.; Westermarck, J., Cancerous inhibitor of protein phosphatase 2A, an emerging human oncoprotein and a potential cancer therapy target. *Cancer research* **2013**, *73*, 6548-53.
46. Bray, F.; Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Siegel, R. L.; Torre, L. A.; Jemal, A., Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians* **2018**, *68*, 394-424.
47. Las cifras del cáncer en España. https://seom.org/seomcms/images/stories/recursos/Cifras_del_cancer_2020.pdf
48. Travis, W. D.; Brambilla, E.; Nicholson, A. G.; Yatabe, Y.; Austin, J. H. M.; Beasley, M. B.; Chirieac, L. R.; Dacic, S.; Duhig, E.; Flieder, D. B.; Geisinger, K.; Hirsch, F. R.; Ishikawa, Y.; Kerr, K. M.; Noguchi, M.; Pelosi, G.; Powell, C. A.; Tsao, M. S.; Wistuba, I., The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* **2015**, *10*, 1243-1260.
49. Molina, J. R.; Yang, P.; Cassivi, S. D.; Schild, S. E.; Adjei, A. A., Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship. *Mayo Clinic proceedings* **2008**, *83*, 584-94.

50. Athey, V. L.; Walters, S. J.; Rogers, T. K., Symptoms at lung cancer diagnosis are associated with major differences in prognosis. *Thorax* **2018**, *73*, 1177-1181.
51. Goldstraw, P.; Chansky, K.; Crowley, J.; Rami-Porta, R.; Asamura, H.; Eberhardt, W. E.; Nicholson, A. G.; Groome, P.; Mitchell, A.; Bolejack, V., The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for Revision of the TNM Stage Groupings in the Forthcoming (Eighth) Edition of the TNM Classification for Lung Cancer. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* **2016**, *11*, 39-51.
52. Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Dikshit, R.; Eser, S.; Mathers, C.; Rebelo, M.; Parkin, D. M.; Forman, D.; Bray, F., Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International journal of cancer* **2015**, *136*, E359-86.
53. Hecht, S. S., Lung carcinogenesis by tobacco smoke. *International journal of cancer* **2012**, *131*, 2724-32.
54. Dasgupta, P.; Rizwani, W.; Pillai, S.; Kinkade, R.; Kovacs, M.; Rastogi, S.; Banerjee, S.; Carless, M.; Kim, E.; Coppola, D.; Haura, E.; Chellappan, S., Nicotine induces cell proliferation, invasion and epithelial-mesenchymal transition in a variety of human cancer cell lines. *International journal of cancer* **2009**, *124*, 36-45.
55. Grando, S. A., Connections of nicotine to cancer. *Nature reviews. Cancer* **2014**, *14*, 419-29.
56. Schaal, C.; Chellappan, S. P., Nicotine-mediated cell proliferation and tumor progression in smoking-related cancers. *Molecular cancer research : MCR* **2014**, *12*, 14-23.
57. Singh, S.; Pillai, S.; Chellappan, S., Nicotinic acetylcholine receptor signaling in tumor growth and metastasis. *Journal of oncology* **2011**, *2011*, 456743.
58. Pillai, S.; Chellappan, S., $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor subunit in angiogenesis and epithelial to mesenchymal transition. *Current drug targets* **2012**, *13*, 671-9.
59. Schuller, H. M., Regulatory role of the $\alpha 7$ nAChR in cancer. *Current drug targets* **2012**, *13*, 680-7.
60. Zhang, C.; Ding, X. P.; Zhao, Q. N.; Yang, X. J.; An, S. M.; Wang, H.; Xu, L.; Zhu, L.; Chen, H. Z., Role of $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptor in nicotine-induced invasion and epithelial-to-mesenchymal transition in human non-small cell lung cancer cells. *Oncotarget* **2016**, *7*, 59199-59208.
61. Wang, S.; Hu, Y., $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors in lung cancer. *Oncology letters* **2018**, *16*, 1375-1382.
62. Yang, Z.; Hackshaw, A.; Feng, Q.; Fu, X.; Zhang, Y.; Mao, C.; Tang, J., Comparison of gefitinib, erlotinib and afatinib in non-small cell lung cancer: A meta-analysis. *International journal of cancer* **2017**, *140*, 2805-2819.
63. Sharma, G. G.; Mota, I.; Mologni, L.; Patrucco, E.; Gambacorti-Passerini, C.; Chiarle, R., Tumor Resistance against ALK Targeted Therapy-Where It Comes From and Where It Goes. *Cancers* **2018**, *10*.
64. Kartalou, M.; Essigmann, J. M., Mechanisms of resistance to cisplatin. *Mutation research* **2001**, *478*, 23-43.
65. Dasari, S.; Tchounwou, P. B., Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *European journal of pharmacology* **2014**, *740*, 364-78.
66. Jamieson, E. R.; Lippard, S. J., Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin-DNA Adducts. *Chemical reviews* **1999**, *99*, 2467-98.
67. Siddik, Z. H., Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* **2003**, *22*, 7265-79.

68. Kelland, L., The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nature reviews. Cancer* **2007**, 7, 573-84.
69. Mandinova, A.; Lee, S. W., The p53 pathway as a target in cancer therapeutics: obstacles and promise. *Science translational medicine* **2011**, 3, 64rv1.
70. Cepeda, V.; Fuertes, M. A.; Castilla, J.; Alonso, C.; Quevedo, C.; Pérez, J. M., Biochemical mechanisms of cisplatin cytotoxicity. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry* **2007**, 7, 3-18.
71. Zhou, J.; Kang, Y.; Chen, L.; Wang, H.; Liu, J.; Zeng, S.; Yu, L., The Drug-Resistance Mechanisms of Five Platinum-Based Antitumor Agents. *Frontiers in pharmacology* **2020**, 11, 343.
72. Suganuma, M.; Fujiki, H.; Suguri, H.; Yoshizawa, S.; Hirota, M.; Nakayasu, M.; Ojika, M.; Wakamatsu, K.; Yamada, K.; Sugimura, T., Okadaic acid: an additional non-phorbol-12-tetradecanoate-13-acetate-type tumor promoter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1988**, 85, 1768-71.
73. Carratù, M. R.; Signorile, A.; De Rasmio, D.; Reale, A.; Vacca, A., Pharmacological Activation of Protein Phosphatase 2 A (PP2A): A Novel Strategy to Fight Against Human Malignancies? *Current medicinal chemistry* **2016**, 23, 4286-4296.
74. Li, H.-H.; Cai, X.; Shouse, G. P.; Piluso, L. G.; Liu, X., A specific PP2A regulatory subunit, B56gamma, mediates DNA damage-induced dephosphorylation of p53 at Thr55. *The EMBO journal* **2007**, 26, 402-411.
75. Wang, S. S.; Esplin, E. D.; Li, J. L.; Huang, L.; Gazdar, A.; Minna, J.; Evans, G. A., Alterations of the PPP2R1B gene in human lung and colon cancer. *Science (New York, N.Y.)* **1998**, 282, 284-7.
76. Ruediger, R.; Ruiz, J.; Walter, G., Human cancer-associated mutations in the A α subunit of protein phosphatase 2A increase lung cancer incidence in A α knock-in and knockout mice. *Molecular and cellular biology* **2011**, 31, 3832-44.
77. Lei, N.; Peng, B.; Zhang, J. Y., CIP2A regulates cell proliferation via the AKT signaling pathway in human lung cancer. *Oncology reports* **2014**, 32, 1689-94.
78. Xin, M.; Deng, X., Nicotine inactivation of the proapoptotic function of Bax through phosphorylation. *The Journal of biological chemistry* **2005**, 280, 10781-9.
79. Wang, M.; Liu, Z. M.; Li, X. C.; Yao, Y. T.; Yin, Z. X., Activation of ERK1/2 and Akt is associated with cisplatin resistance in human lung cancer cells. *Journal of chemotherapy (Florence, Italy)* **2013**, 25, 162-9.
80. Xin, M.; Deng, X., Protein phosphatase 2A enhances the proapoptotic function of Bax through dephosphorylation. *The Journal of biological chemistry* **2006**, 281, 18859-67.
81. Janssens, V.; Rebollo, A., The role and therapeutic potential of Ser/Thr phosphatase PP2A in apoptotic signalling networks in human cancer cells. *Current molecular medicine* **2012**, 12, 268-87.
82. Dementia. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia>
83. 2020 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia* **2020**, 16, 391-460.
84. Alzheimer, A., Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Zentralbl. Nervenhe. Psych.* **1907**, 18, 177-179.
85. Braak, H.; Braak, E., Frequency of Stages of Alzheimer-Related Lesions in Different Age Categories. *Neurobiology of aging* **1997**, 18, 351-357.

86. Khan, U. A.; Liu, L.; Provenzano, F. A.; Berman, D. E.; Profaci, C. P.; Sloan, R.; Mayeux, R.; Duff, K. E.; Small, S. A., Molecular drivers and cortical spread of lateral entorhinal cortex dysfunction in preclinical Alzheimer's disease. *Nature neuroscience* **2014**, *17*, 304-11.
87. Kim, J.; Basak, J. M.; Holtzman, D. M., The role of apolipoprotein E in Alzheimer's disease. *Neuron* **2009**, *63*, 287-303.
88. Sanabria-Castro, A.; Alvarado-Echeverría, I.; Monge-Bonilla, C., Molecular Pathogenesis of Alzheimer's Disease: An Update. *Annals of Neurosciences* **2017**, *24*, 46-54.
89. Bartus, R. T.; Dean, R. L., 3rd; Beer, B.; Lippa, A. S., The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science (New York, N.Y.)* **1982**, *217*, 408-14.
90. Nilsson, L.; Nordberg, A.; Hardy, J.; Wester, P.; Winblad, B., Physostigmine restores 3H-acetylcholine efflux from Alzheimer brain slices to normal level. *Journal of neural transmission* **1986**, *67*, 275-85.
91. Rylett, R. J.; Ball, M. J.; Colhoun, E. H., Evidence for high affinity choline transport in synaptosomes prepared from hippocampus and neocortex of patients with Alzheimer's disease. *Brain research* **1983**, *289*, 169-75.
92. Perry, E. K.; Morris, C. M.; Court, J. A.; Cheng, A.; Fairbairn, A. F.; McKeith, I. G.; Irving, D.; Brown, A.; Perry, R. H., Alteration in nicotine binding sites in Parkinson's disease, Lewy body dementia and Alzheimer's disease: possible index of early neuropathology. *Neuroscience* **1995**, *64*, 385-95.
93. Giacobini, E., Cholinergic receptors in human brain: effects of aging and Alzheimer disease. *Journal of neuroscience research* **1990**, *27*, 548-60.
94. Ehret, M. J.; Chamberlin, K. W., Current Practices in the Treatment of Alzheimer Disease: Where is the Evidence After the Phase III Trials? *Clinical therapeutics* **2015**, *37*, 1604-16.
95. Lewerenz, J.; Maher, P., Chronic Glutamate Toxicity in Neurodegenerative Diseases-What is the Evidence? *Frontiers in neuroscience* **2015**, *9*, 469.
96. Hardy, J.; Higgins, G., Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science (New York, N.Y.)* **1992**, *256*, 184-185.
97. Selkoe, D. J., Alzheimer's disease: a central role for amyloid. *Journal of neuropathology and experimental neurology* **1994**, *53*, 438-47.
98. Dawkins, E.; Small, D. H., Insights into the physiological function of the β -amyloid precursor protein: beyond Alzheimer's disease. *Journal of neurochemistry* **2014**, *129*, 756-69.
99. Coronel, R.; Bernabeu-Zornoza, A.; Palmer, C.; Muñoz-Moreno, M.; Zambrano, A.; Cano, E.; Liste, I., Role of Amyloid Precursor Protein (APP) and Its Derivatives in the Biology and Cell Fate Specification of Neural Stem Cells. *Molecular neurobiology* **2018**, *55*, 7107-7117.
100. Kamenetz, F.; Tomita, T.; Hsieh, H.; Seabrook, G.; Borchelt, D.; Iwatsubo, T.; Sisodia, S.; Malinow, R., APP processing and synaptic function. *Neuron* **2003**, *37*, 925-37.
101. Lanoiselée, H. M.; Nicolas, G.; Wallon, D.; Rovelet-Lecrux, A.; Lacour, M.; Rousseau, S.; Richard, A. C.; Pasquier, F.; Rollin-Sillaire, A.; Martinaud, O.; Quillard-Muraine, M.; de la Sayette, V.; Boutoleau-Bretonniere, C.; Etcharry-Bouyx, F.; Chauviré, V.; Sarazin, M.; le Ber, I.; Epelbaum, S.; Jonveaux, T.; Rouaud, O.; Ceccaldi, M.; Félician, O.; Godefroy, O.; Formaglio, M.; Croisile, B.; Auriacombe, S.; Chamard, L.; Vincent, J. L.; Sauvée, M.; Marelli-Tosi, C.; Gabelle, A.; Ozsancak, C.; Pariente, J.; Paquet, C.; Hannequin, D.; Campion, D., APP, PSEN1, and PSEN2 mutations in early-onset Alzheimer disease: A genetic screening study of familial and sporadic cases. *PLoS medicine* **2017**, *14*, e1002270.

102. Cline, E. N.; Bicca, M. A.; Viola, K. L.; Klein, W. L., The Amyloid- β Oligomer Hypothesis: Beginning of the Third Decade. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* **2018**, *64*, S567-s610.
103. Eikelenboom, P.; Zhan, S.-S.; van Gool, W. A.; Allsop, D., Inflammatory mechanisms in Alzheimer's disease. *Trends in Pharmacological Sciences* **1994**, *15*, 447-450.
104. Sadigh-Eteghad, S.; Sabermarouf, B.; Majdi, A.; Talebi, M.; Farhoudi, M.; Mahmoudi, J., Amyloid-beta: a crucial factor in Alzheimer's disease. *Medical principles and practice : international journal of the Kuwait University, Health Science Centre* **2015**, *24*, 1-10.
105. Herrup, K., The case for rejecting the amyloid cascade hypothesis. *Nature neuroscience* **2015**, *18*, 794-9.
106. Cárdenas-Aguayo Mdel, C.; Gómez-Virgilio, L.; DeRosa, S.; Meraz-Ríos, M. A., The role of tau oligomers in the onset of Alzheimer's disease neuropathology. *ACS chemical neuroscience* **2014**, *5*, 1178-91.
107. Biundo, F.; Del Prete, D.; Zhang, H.; Arancio, O.; D'Adamio, L., A role for tau in learning, memory and synaptic plasticity. *Scientific reports* **2018**, *8*, 3184.
108. Weingarten, M. D.; Lockwood, A. H.; Hwo, S. Y.; Kirschner, M. W., A protein factor essential for microtubule assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1975**, *72*, 1858-62.
109. Goedert, M.; Wischik, C. M.; Crowther, R. A.; Walker, J. E.; Klug, A., Cloning and sequencing of the cDNA encoding a core protein of the paired helical filament of Alzheimer disease: identification as the microtubule-associated protein tau. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1988**, *85*, 4051-5.
110. Rubinsztein, D. C., The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration. *Nature* **2006**, *443*, 780-6.
111. Holmes, B. B.; Furman, J. L.; Mahan, T. E.; Yamasaki, T. R.; Mirbaha, H.; Eades, W. C.; Belaygorod, L.; Cairns, N. J.; Holtzman, D. M.; Diamond, M. I., Proteopathic tau seeding predicts tauopathy in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2014**, *111*, E4376-85.
112. Barton, A. J.; Harrison, P. J.; Najlerahim, A.; Heffernan, J.; McDonald, B.; Robinson, J. R.; Davies, D. C.; Harrison, W. J.; Mitra, P.; Hardy, J. A.; et al., Increased tau messenger RNA in Alzheimer's disease hippocampus. *The American journal of pathology* **1990**, *137*, 497-502.
113. Khatoon, S.; Grundke-Iqbal, I.; Iqbal, K., Brain levels of microtubule-associated protein tau are elevated in Alzheimer's disease: a radioimmuno-slot-blot assay for nanograms of the protein. *Journal of neurochemistry* **1992**, *59*, 750-3.
114. Avila, J.; Lucas, J. J.; Perez, M.; Hernandez, F., Role of tau protein in both physiological and pathological conditions. *Physiological reviews* **2004**, *84*, 361-84.
115. Wang, Y.; Mandelkow, E., Tau in physiology and pathology. *Nature reviews. Neuroscience* **2016**, *17*, 5-21.
116. Ksiazek-Reding, H.; Liu, W. K.; Yen, S. H., Phosphate analysis and dephosphorylation of modified tau associated with paired helical filaments. *Brain research* **1992**, *597*, 209-19.
117. Martin, L.; Latypova, X.; Wilson, C. M.; Magnaudeix, A.; Perrin, M. L.; Terro, F., Tau protein phosphatases in Alzheimer's disease: the leading role of PP2A. *Ageing research reviews* **2013**, *12*, 39-49.

118. Ferrer, I.; Gomez-Isla, T.; Puig, B.; Freixes, M.; Ribé, E.; Dalfó, E.; Avila, J., Current advances on different kinases involved in tau phosphorylation, and implications in Alzheimer's disease and tauopathies. *Current Alzheimer research* **2005**, 2, 3-18.
119. Iqbal, K.; Grundke-Iqbal, I., Pharmacological approaches of neurofibrillary degeneration. *Current Alzheimer research* **2005**, 2, 335-41.
120. Wang, J. Z.; Xia, Y. Y.; Grundke-Iqbal, I.; Iqbal, K., Abnormal hyperphosphorylation of tau: sites, regulation, and molecular mechanism of neurofibrillary degeneration. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* **2013**, 33 Suppl 1, S123-39.
121. Liu, F.; Grundke-Iqbal, I.; Iqbal, K.; Gong, C. X., Contributions of protein phosphatases PP1, PP2A, PP2B and PP5 to the regulation of tau phosphorylation. *The European journal of neuroscience* **2005**, 22, 1942-50.
122. Poppek, D.; Keck, S.; Ermak, G.; Jung, T.; Stolzing, A.; Ullrich, O.; Davies, K. J.; Grune, T., Phosphorylation inhibits turnover of the tau protein by the proteasome: influence of RCAN1 and oxidative stress. *The Biochemical journal* **2006**, 400, 511-20.
123. Khatoon, S.; Grundke-Iqbal, I.; Iqbal, K., Levels of normal and abnormally phosphorylated tau in different cellular and regional compartments of Alzheimer disease and control brains. *FEBS letters* **1994**, 351, 80-4.
124. Braak, H.; Thal, D. R.; Ghebremedhin, E.; Del Tredici, K., Stages of the pathologic process in Alzheimer disease: age categories from 1 to 100 years. *Journal of neuropathology and experimental neurology* **2011**, 70, 960-9.
125. Rapoport, M.; Dawson, H. N.; Binder, L. I.; Vitek, M. P.; Ferreira, A., Tau is essential to beta - amyloid-induced neurotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2002**, 99, 6364-9.
126. SantaCruz, K. S.; Sonnen, J. A.; Pezouh, M. K.; Desrosiers, M. F.; Nelson, P. T.; Tyas, S. L., Alzheimer disease pathology in subjects without dementia in 2 studies of aging: the Nun Study and the Adult Changes in Thought Study. *Journal of neuropathology and experimental neurology* **2011**, 70, 832-40.
127. Watkins, P. B.; Zimmerman, H. J.; Knapp, M. J.; Gracon, S. I.; Lewis, K. W., Hepatotoxic effects of tacrine administration in patients with Alzheimer's disease. *Jama* **1994**, 271, 992-8.
128. Huang, L. K.; Chao, S. P.; Hu, C. J., Clinical trials of new drugs for Alzheimer disease. *Journal of biomedical science* **2020**, 27, 18.
129. Becker, R. E.; Greig, N. H.; Giacobini, E., Why do so many drugs for Alzheimer's disease fail in development? Time for new methods and new practices? *Journal of Alzheimer's disease : JAD* **2008**, 15, 303-25.
130. Vogelsberg-Ragaglia, V.; Schuck, T.; Trojanowski, J. Q.; Lee, V. M., PP2A mRNA expression is quantitatively decreased in Alzheimer's disease hippocampus. *Experimental neurology* **2001**, 168, 402-12.
131. Sontag, E.; Luangpirom, A.; Hladik, C.; Mudrak, I.; Ogris, E.; Speciale, S.; White, C. L., 3rd, Altered expression levels of the protein phosphatase 2A ABalphaC enzyme are associated with Alzheimer disease pathology. *Journal of neuropathology and experimental neurology* **2004**, 63, 287-301.
132. Park, H. J.; Lee, K. W.; Oh, S.; Yan, R.; Zhang, J.; Beach, T. G.; Adler, C. H.; Voronkov, M.; Braithwaite, S. P.; Stock, J. B.; Mouradian, M. M., Protein Phosphatase 2A and Its Methylation Modulating Enzymes LCMT-1 and PME-1 Are Dysregulated in Tauopathies of Progressive Supranuclear Palsy and Alzheimer Disease. *Journal of neuropathology and experimental neurology* **2018**, 77, 139-148.

133. Wei, H.; Zhang, H. L.; Xie, J. Z.; Meng, D. L.; Wang, X. C.; Ke, D.; Zeng, J.; Liu, R., Erratum to: Protein Phosphatase 2A as a Drug Target in the Treatment of Cancer and Alzheimer's Disease. *Current medical science* **2020**, *40*, 389.
134. Liu, R.; Zhou, X. W.; Tanila, H.; Bjorkdahl, C.; Wang, J. Z.; Guan, Z. Z.; Cao, Y.; Gustafsson, J. A.; Winblad, B.; Pei, J. J., Phosphorylated PP2A (tyrosine 307) is associated with Alzheimer neurofibrillary pathology. *Journal of cellular and molecular medicine* **2008**, *12*, 241-57.
135. Tanimukai, H.; Grundke-Iqbal, I.; Iqbal, K., Up-regulation of inhibitors of protein phosphatase-2A in Alzheimer's disease. *The American journal of pathology* **2005**, *166*, 1761-71.
136. Wang, X.; Blanchard, J.; Tung, Y. C.; Grundke-Iqbal, I.; Iqbal, K., Inhibition of Protein Phosphatase-2A (PP2A) by I1PP2A Leads to Hyperphosphorylation of Tau, Neurodegeneration, and Cognitive Impairment in Rats. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* **2015**, *45*, 423-35.
137. Zhang, Y.; Ma, R.-H.; Li, X.-C.; Zhang, J.-Y.; Shi, H.-R.; Wei, W.; Luo, D.-J.; Wang, Q.; Wang, J.-Z.; Liu, G.-P., Silencing I2PP2A Rescues Tau Pathologies and Memory Deficits through Rescuing PP2A and Inhibiting GSK-3 β Signaling in Human Tau Transgenic Mice. *Frontiers in aging neuroscience* **2014**, *6*.
138. Kamat, P. K.; Nath, C., Okadaic acid: a tool to study regulatory mechanisms for neurodegeneration and regeneration in Alzheimer's disease. *Neural regeneration research* **2015**, *10*, 365-7.
139. Lee, M. S.; Kao, S. C.; Lemere, C. A.; Xia, W.; Tseng, H. C.; Zhou, Y.; Neve, R.; Ahljianian, M. K.; Tsai, L. H., APP processing is regulated by cytoplasmic phosphorylation. *The Journal of cell biology* **2003**, *163*, 83-95.
140. Colombo, A.; Bastone, A.; Ploia, C.; Scip, A.; Salmona, M.; Forloni, G.; Borsello, T., JNK regulates APP cleavage and degradation in a model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of disease* **2009**, *33*, 518-25.
141. Chan, S. F.; Sucher, N. J., An NMDA receptor signaling complex with protein phosphatase 2A. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **2001**, *21*, 7985-92.
142. Farinelli, M.; Heitz, F. D.; Grewe, B. F.; Tyagarajan, S. K.; Helmchen, F.; Mansuy, I. M., Selective regulation of NR2B by protein phosphatase-1 for the control of the NMDA receptor in neuroprotection. *PloS one* **2012**, *7*, e34047.
143. Taleski, G.; Sontag, E., Protein phosphatase 2A and tau: an orchestrated 'Pas de Deux'. *FEBS letters* **2018**, *592*, 1079-1095.
144. Elgenaidi, I. S.; Spiers, J. P., Regulation of the phosphoprotein phosphatase 2A system and its modulation during oxidative stress: A potential therapeutic target? *Pharmacology & therapeutics* **2019**, *198*, 68-89.
145. Arribas, R. L.; Romero, A.; Egea, J.; de Los Ríos, C., Modulation of serine/threonine phosphatases by melatonin: therapeutic approaches in neurodegenerative diseases. *British journal of pharmacology* **2018**, *175*, 3220-3229.
146. Pelech, S.; Cohen, P., The protein phosphatases involved in cellular regulation. 1. Modulation of protein phosphatases-1 and 2A by histone H1, protamine, polylysine and heparin. *European journal of biochemistry* **1985**, *148*, 245-51.

147. Sangodkar, J.; Perl, A.; Tohme, R.; Kiselar, J.; Kastrinsky, D. B.; Zaware, N.; Izadmehr, S.; Mazhar, S.; Wiredja, D. D.; O'Connor, C. M.; Hoon, D.; Dhawan, N. S.; Schlatzer, D.; Yao, S.; Leonard, D.; Borczuk, A. C.; Gokulrangan, G.; Wang, L.; Svenson, E.; Farrington, C. C.; Yuan, E.; Avelar, R. A.; Stachnik, A.; Smith, B.; Gidwani, V.; Giannini, H. M.; McQuaid, D.; McClinch, K.; Wang, Z.; Levine, A. C.; Sears, R. C.; Chen, E. Y.; Duan, Q.; Datt, M.; Haider, S.; Ma'ayan, A.; DiFeo, A.; Sharma, N.; Galsky, M. D.; Brautigan, D. L.; Ioannou, Y. A.; Xu, W.; Chance, M. R.; Ohlmeyer, M.; Narla, G., Activation of tumor suppressor protein PP2A inhibits KRAS-driven tumor growth. *The Journal of clinical investigation* **2017**, *127*, 2081-2090.
148. Janghorban, M.; Farrell, A. S.; Allen-Petersen, B. L.; Pelz, C.; Daniel, C. J.; Oddo, J.; Langer, E. M.; Christensen, D. J.; Sears, R. C., Targeting c-MYC by antagonizing PP2A inhibitors in breast cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2014**, *111*, 9157-62.
149. Saddoughi, S. A.; Ogretmen, B., Diverse functions of ceramide in cancer cell death and proliferation. *Advances in cancer research* **2013**, *117*, 37-58.
150. Chen, L.; Luo, L. F.; Lu, J.; Li, L.; Liu, Y. F.; Wang, J.; Liu, H.; Song, H.; Jiang, H.; Chen, S. J.; Luo, C.; Li, K. K., FTY720 induces apoptosis of M2 subtype acute myeloid leukemia cells by targeting sphingolipid metabolism and increasing endogenous ceramide levels. *PloS one* **2014**, *9*, e103033.
151. Zonta, F.; Pagano, M. A.; Trentin, L.; Tibaldi, E.; Frezzato, F.; Trimarco, V.; Facco, M.; Zagotto, G.; Pavan, V.; Ribaudo, G.; Bordin, L.; Semenzato, G.; Brunati, A. M., Lyn sustains oncogenic signaling in chronic lymphocytic leukemia by strengthening SET-mediated inhibition of PP2A. *Blood* **2015**, *125*, 3747-55.
152. Omar, H. A.; Chou, C. C.; Berman-Booty, L. D.; Ma, Y.; Hung, J. H.; Wang, D.; Kogure, T.; Patel, T.; Terracciano, L.; Muthusamy, N.; Byrd, J. C.; Kulp, S. K.; Chen, C. S., Antitumor effects of OSU-2S, a nonimmunosuppressive analogue of FTY720, in hepatocellular carcinoma. *Hepatology (Baltimore, Md.)* **2011**, *53*, 1943-58.
153. Christensen, D. J.; Chen, Y.; Oddo, J.; Matta, K. M.; Neil, J.; Davis, E. D.; Volkheimer, A. D.; Lanasa, M. C.; Friedman, D. R.; Goodman, B. K.; Gockerman, J. P.; Diehl, L. F.; de Castro, C. M.; Moore, J. O.; Vitek, M. P.; Weinberg, J. B., SET oncoprotein overexpression in B-cell chronic lymphocytic leukemia and non-Hodgkin lymphoma: a predictor of aggressive disease and a new treatment target. *Blood* **2011**, *118*, 4150-4158.
154. Agarwal, A.; MacKenzie, R. J.; Pippa, R.; Eide, C. A.; Oddo, J.; Tyner, J. W.; Sears, R.; Vitek, M. P.; Otero, M. D.; Christensen, D. J.; Druker, B. J., Antagonism of SET using OP449 enhances the efficacy of tyrosine kinase inhibitors and overcomes drug resistance in myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* **2014**, *20*, 2092-2103.
155. Ramaswamy, K.; Spitzer, B.; Kentsis, A., Therapeutic Re-Activation of Protein Phosphatase 2A in Acute Myeloid Leukemia. *Frontiers in oncology* **2015**, *5*, 16.
156. Wang, S.; Xie, W.; Wang, D.; Peng, Z.; Zheng, Y.; Liu, N.; Dai, W.; Wang, Y.; Wang, Z.; Yang, Y.; Chen, Y., Discovery of a small molecule targeting SET-PP2A interaction to overcome BCR-ABL T315I mutation of chronic myeloid leukemia. *Oncotarget* **2015**, *6*, 12128-40.
157. Wang, J.; Okkeri, J.; Pavic, K.; Wang, Z.; Kauko, O.; Halonen, T.; Sarek, G.; Ojala, P. M.; Rao, Z.; Xu, W.; Westermarck, J., Oncoprotein CIP2A is stabilized via interaction with tumor suppressor PP2A/B56. *EMBO reports* **2017**, *18*, 437-450.
158. Adams, J.; Kauffman, M., Development of the proteasome inhibitor Velcade (Bortezomib). *Cancer investigation* **2004**, *22*, 304-11.
159. Hou, D. R.; Huang, A. C.; Shiau, C. W.; Wang, C. Y.; Yu, H. C.; Chen, K. F., Bortezomib congeners induce apoptosis of hepatocellular carcinoma via CIP2A inhibition. *Molecules (Basel, Switzerland)* **2013**, *18*, 15398-411.

160. Lin, Y. C.; Chen, K. C.; Chen, C. C.; Cheng, A. L.; Chen, K. F., CIP2A-mediated Akt activation plays a role in bortezomib-induced apoptosis in head and neck squamous cell carcinoma cells. *Oral oncology* **2012**, *48*, 585-93.
161. Tseng, L. M.; Liu, C. Y.; Chang, K. C.; Chu, P. Y.; Shiau, C. W.; Chen, K. F., CIP2A is a target of bortezomib in human triple negative breast cancer cells. *Breast cancer research : BCR* **2012**, *14*, R68.
162. Liu, Z.; Ma, L.; Wen, Z. S.; Hu, Z.; Wu, F. Q.; Li, W.; Liu, J.; Zhou, G. B., Cancerous inhibitor of PP2A is targeted by natural compound celastrol for degradation in non-small-cell lung cancer. *Carcinogenesis* **2014**, *35*, 905-14.
163. Liu, Z.; Ma, L.; Wen, Z. S.; Cheng, Y. X.; Zhou, G. B., Ethoxysanguinarine Induces Inhibitory Effects and Downregulates CIP2A in Lung Cancer Cells. *ACS medicinal chemistry letters* **2014**, *5*, 113-8.
164. Wu, Y. L.; Zhou, C.; Liam, C. K.; Wu, G.; Liu, X.; Zhong, Z.; Lu, S.; Cheng, Y.; Han, B.; Chen, L.; Huang, C.; Qin, S.; Zhu, Y.; Pan, H.; Liang, H.; Li, E.; Jiang, G.; How, S. H.; Fernando, M. C. L.; Zhang, Y.; Xia, F.; Zuo, Y., First-line erlotinib versus gemcitabine/cisplatin in patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer: analyses from the phase III, randomized, open-label, ENSURE study. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* **2015**, *26*, 1883-1889.
165. Chao, T. T.; Wang, C. Y.; Lai, C. C.; Chen, Y. L.; Tsai, Y. T.; Chen, P. T.; Lin, H. I.; Huang, Y. C.; Shiau, C. W.; Yu, C. J.; Chen, K. F., TD-19, an erlotinib derivative, induces epidermal growth factor receptor wild-type nonsmall-cell lung cancer apoptosis through CIP2A-mediated pathway. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **2014**, *351*, 352-8.
166. Chen, K. F.; Pao, K. C.; Su, J. C.; Chou, Y. C.; Liu, C. Y.; Chen, H. J.; Huang, J. W.; Kim, I.; Shiau, C. W., Development of erlotinib derivatives as CIP2A-ablating agents independent of EGFR activity. *Bioorganic & medicinal chemistry* **2012**, *20*, 6144-53.
167. Liu, C. Y.; Huang, T. T.; Huang, C. T.; Hu, M. H.; Wang, D. S.; Wang, W. L.; Tsai, W. C.; Lee, C. H.; Lau, K. Y.; Yang, H. P.; Chen, M. H.; Shiau, C. W.; Tseng, L. M.; Chen, K. F., EGFR-independent Elk1/CIP2A signalling mediates apoptotic effect of an erlotinib derivative TD52 in triple-negative breast cancer cells. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* **2017**, *72*, 112-123.
168. Wang, C. Y.; Chao, T. T.; Chang, F. Y.; Chen, Y. L.; Tsai, Y. T.; Lin, H. I.; Huang, Y. C.; Shiau, C. W.; Yu, C. J.; Chen, K. F., CIP2A mediates erlotinib-induced apoptosis in non-small cell lung cancer cells without EGFR mutation. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)* **2014**, *85*, 152-60.
169. Yu, H. C.; Hung, M. H.; Chen, Y. L.; Chu, P. Y.; Wang, C. Y.; Chao, T. T.; Liu, C. Y.; Shiau, C. W.; Chen, K. F., Erlotinib derivative inhibits hepatocellular carcinoma by targeting CIP2A to reactivate protein phosphatase 2A. *Cell death & disease* **2014**, *5*, e1359.
170. Kim, M. O.; Choe, M. H.; Yoon, Y. N.; Ahn, J.; Yoo, M.; Jung, K. Y.; An, S.; Hwang, S. G.; Oh, J. S.; Kim, J. S., Antihelminthic drug niclosamide inhibits CIP2A and reactivates tumor suppressor protein phosphatase 2A in non-small cell lung cancer cells. *Biochemical pharmacology* **2017**, *144*, 78-89.
171. Cristóbal, I.; Garcia-Orti, L.; Cirauqui, C.; Alonso, M. M.; Calasanz, M. J.; Otero, M. D., PP2A impaired activity is a common event in acute myeloid leukemia and its activation by forskolin has a potent anti-leukemic effect. *Leukemia* **2011**, *25*, 606-14.
172. Cristóbal, I.; Rincón, R.; Manso, R.; Madoz-Gúrpide, J.; Caramés, C.; del Puerto-Nevado, L.; Rojo, F.; García-Foncillas, J., Hyperphosphorylation of PP2A in colorectal cancer and the potential therapeutic value showed by its forskolin-induced dephosphorylation and activation. *Biochimica et biophysica acta* **2014**, *1842*, 1823-9.

173. Lee, K. W.; Chen, W.; Junn, E.; Im, J. Y.; Grosso, H.; Sonsalla, P. K.; Feng, X.; Ray, N.; Fernandez, J. R.; Chao, Y.; Masliah, E.; Voronkov, M.; Braithwaite, S. P.; Stock, J. B.; Mouradian, M. M., Enhanced phosphatase activity attenuates α -synucleinopathy in a mouse model. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **2011**, *31*, 6963-71.
174. Lee, K. W.; Im, J. Y.; Woo, J. M.; Grosso, H.; Kim, Y. S.; Cristovao, A. C.; Sonsalla, P. K.; Schuster, D. S.; Jalbut, M. M.; Fernandez, J. R.; Voronkov, M.; Junn, E.; Braithwaite, S. P.; Stock, J. B.; Mouradian, M. M., Neuroprotective and anti-inflammatory properties of a coffee component in the MPTP model of Parkinson's disease. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* **2013**, *10*, 143-53.
175. Basurto-Islas, G.; Blanchard, J.; Tung, Y. C.; Fernandez, J. R.; Voronkov, M.; Stock, M.; Zhang, S.; Stock, J. B.; Iqbal, K., Therapeutic benefits of a component of coffee in a rat model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging* **2014**, *35*, 2701-2712.
176. Kickstein, E.; Krauss, S.; Thornhill, P.; Rutschow, D.; Zeller, R.; Sharkey, J.; Williamson, R.; Fuchs, M.; Köhler, A.; Glossmann, H.; Schneider, R.; Sutherland, C.; Schweiger, S., Biguanide metformin acts on tau phosphorylation via mTOR/protein phosphatase 2A (PP2A) signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2010**, *107*, 21830-5.
177. Li, L.; Sengupta, A.; Haque, N.; Grundke-Iqbal, I.; Iqbal, K., Memantine inhibits and reverses the Alzheimer type abnormal hyperphosphorylation of tau and associated neurodegeneration. *FEBS letters* **2004**, *566*, 261-9.
178. Chohan, M. O.; Khatoon, S.; Iqbal, I. G.; Iqbal, K., Involvement of I2PP2A in the abnormal hyperphosphorylation of tau and its reversal by Memantine. *FEBS letters* **2006**, *580*, 3973-9.
179. Noh, M. Y.; Koh, S. H.; Kim, S. M.; Maurice, T.; Ku, S. K.; Kim, S. H., Neuroprotective effects of donepezil against A β 42-induced neuronal toxicity are mediated through not only enhancing PP2A activity but also regulating GSK-3 β and nAChRs activity. *Journal of neurochemistry* **2013**, *127*, 562-74.
180. Koh, P. O., Melatonin attenuates decrease of protein phosphatase 2A subunit B in ischemic brain injury. *Journal of pineal research* **2012**, *52*, 57-61.
181. St-Cyr Giguère, F.; Attiori Essis, S.; Chagniel, L.; Germain, M.; Cyr, M.; Massicotte, G., The sphingosine-1-phosphate receptor 1 agonist SEW2871 reduces Tau-Ser262 phosphorylation in rat hippocampal slices. *Brain research* **2017**, *1658*, 51-59.
182. Wang, X. L.; Xiong, Y.; Yang, Y.; Tuo, Q. Z.; Wang, X. C.; Chen, R.; Tian, Q.; Zhang, Z. P.; Yan, X.; Yang, Z. Y.; Wang, J. Z.; Liu, R., A novel tacrine-dihydropyridine hybrid (-)SCR1693 induces tau dephosphorylation and inhibits A β generation in cells. *European journal of pharmacology* **2015**, *754*, 134-9.
183. Xia, Y.; Liu, R.; Chen, R.; Tian, Q.; Zeng, K.; Hu, J.; Liu, X.; Wang, Q.; Wang, P.; Wang, X. C.; Wang, J. Z., Novel multipotent AChEI-CCB attenuates hyperhomocysteinemia-induced memory deficits and Neuropathologies in rats. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* **2014**, *42*, 1029-39.
184. de Los Ríos, C.; Egea, J.; Marco-Contelles, J.; León, R.; Samadi, A.; Iriepa, I.; Moraleda, I.; Gálvez, E.; García, A. G.; López, M. G.; Villarroja, M.; Romero, A., Synthesis, inhibitory activity of cholinesterases, and neuroprotective profile of novel 1,8-naphthyridine derivatives. *Journal of medicinal chemistry* **2010**, *53*, 5129-43.
185. Lorrio, S.; Romero, A.; González-Lafuente, L.; Lajarín-Cuesta, R.; Martínez-Sanz, F. J.; Estrada, M.; Samadi, A.; Marco-Contelles, J.; Rodríguez-Franco, M. I.; Villarroja, M.; López, M. G.; de los Ríos, C., PP2A ligand ITH12246 protects against memory impairment and focal cerebral ischemia in mice. *ACS chemical neuroscience* **2013**, *4*, 1267-77.

186. Lajarín-Cuesta, R.; Nanclares, C.; Arranz-Tagarro, J. A.; González-Lafuente, L.; Arribas, R. L.; Araujo de Brito, M.; Gandía, L.; de Los Ríos, C., Gramine Derivatives Targeting Ca(2+) Channels and Ser/Thr Phosphatases: A New Dual Strategy for the Treatment of Neurodegenerative Diseases. *Journal of medicinal chemistry* **2016**, *59*, 6265-80.
187. Gonzalez, D.; Arribas, R. L.; Viejo, L.; Lajarin-Cuesta, R.; de Los Rios, C., Substituent effect of N-benzylated gramine derivatives that prevent the PP2A inhibition and dissipate the neuronal Ca(2+) overload, as a multitarget strategy for the treatment of Alzheimer's disease. *Bioorganic & medicinal chemistry* **2018**, *26*, 2551-2560.
188. Lajarín-Cuesta, R.; Arribas, R. L.; Nanclares, C.; García-Frutos, E. M.; Gandía, L.; de Los Ríos, C., Design and synthesis of multipotent 3-aminomethylindoles and 7-azaindoles with enhanced protein phosphatase 2A-activating profile and neuroprotection. *European journal of medicinal chemistry* **2018**, *157*, 294-309.
189. Schlenk, W.; Schlenk jun., W., Über die Konstitution der Grignardschen Magnesiumverbindungen. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series)* **1929**, *62*, 920-924.
190. Ichikawa, Y.; Isobe, M.; Goto, T., Synthesis of a marine polyether toxin, okadaic acid (2) — synthesis of segment b. *Tetrahedron* **1987**, *43*, 4749-4758.
191. Marco-Contelles, J. L.; Fernández, C.; Gómez, A.; Martín-León, N., Free-radical reactions of some phenylthio-2,3-dideoxyhex-2-enopyranosides. *Tetrahedron Letters* **1990**, *31*, 1467-1470.
192. Fuwa, H.; Sakamoto, K.; Muto, T.; Sasaki, M., Concise synthesis of the C15-C38 fragment of okadaic acid: application of the Suzuki-Miyaura reaction to spiroacetal synthesis. *Organic letters* **2015**, *17*, 366-9.
193. Nakamura, R.; Tanino, K.; Miyashita, M., Total synthesis of scytophycin C. 1. Stereoselective syntheses of the C(1)-C(18) segment and the C(19)-C(31) segment. *Organic letters* **2003**, *5*, 3579-82.
194. Mohapatra, D. K.; Maity, S.; Rao, T. S.; Yadav, J. S.; Sridhar, B., An Efficient Formal Total Synthesis of Cladosporin. *European Journal of Organic Chemistry* **2013**, *2013*, 2859-2863.
195. Clausen, D. J.; Floreancig, P. E., Aromatic cations from oxidative carbon-hydrogen bond cleavage in bimolecular carbon-carbon bond forming reactions. *The Journal of organic chemistry* **2012**, *77*, 6574-82.
196. Nicolaou, K. C.; Duggan, M. E.; Hwang, C. K., Synthesis of the ABC ring system of brevetoxin B. *Journal of the American Chemical Society* **1989**, *111*, 6666-6675.
197. Ma, T.; Pai, S. B.; Zhu, Y. L.; Lin, J. S.; Shanmuganathan, K.; Du, J.; Wang, C.; Kim, H.; Newton, M. G.; Cheng, Y. C.; Chu, C. K., Structure-activity relationships of 1-(2-Deoxy-2-fluoro-beta-L-arabinofuranosyl)pyrimidine nucleosides as anti-hepatitis B virus agents. *Journal of medicinal chemistry* **1996**, *39*, 2835-43.
198. Shoji, M.; Akiyama, N.; Tsubone, K.; Lash, L. L.; Sanders, J. M.; Swanson, G. T.; Sakai, R.; Shimamoto, K.; Oikawa, M.; Sasaki, M., Total Synthesis and Biological Evaluation of Neodysiherbaine A and Analogues. *The Journal of organic chemistry* **2006**, *71*, 5208-5220.
199. Gensini, M.; Altamura, M.; Dimoulas, T.; Fedi, V.; Giannotti, D.; Giuliani, S.; Guidi, A.; Harmat, N. J. S.; Meini, S.; Nannicini, R.; Pasqui, F.; Tramontana, M.; Triolo, A.; Maggi, C. A., Modulation on C- and N-Terminal Moieties of a Series of Potent and Selective Linear Tachykinin NK2 Receptor Antagonists. *ChemMedChem* **2010**, *5*, 65-78.
200. Wipf, P.; Uto, Y.; Yoshimura, S., Total Synthesis of a Stereoisomer of Bistramide C and Assignment of Configuration of the Natural Product. *Chemistry – A European Journal* **2002**, *8*, 1670-1681.
201. Fang, C.; Pang, Y.; Forsyth, C. J., Formal Total Synthesis of Okadaic Acid via Regiocontrolled Gold(I)-Catalyzed Spiroketalizations. *Organic letters* **2010**, *12*, 4528-4531.

202. Bitencourt-Ferreira, G.; de Azevedo, W. F., Jr., Molegro Virtual Docker for Docking. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **2019**, 2053, 149-167.
203. Rigsby, R. E.; Parker, A. B., Using the PyMOL application to reinforce visual understanding of protein structure. *Biochemistry and molecular biology education : a bimonthly publication of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology* **2016**, 44, 433-7.
204. Giard, D. J.; Aaronson, S. A.; Todaro, G. J.; Arnstein, P.; Kersey, J. H.; Dosik, H.; Parks, W. P., In Vitro Cultivation of Human Tumors: Establishment of Cell Lines Derived From a Series of Solid Tumors2. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* **1973**, 51, 1417-1423.
205. Jaramillo, M. L.; Banville, M.; Collins, C.; Paul-Roc, B.; Bourget, L.; O'Connor-McCourt, M., Differential sensitivity of A549 non small lung carcinoma cell responses to epidermal growth factor receptor pathway inhibitors. *Cancer Biology & Therapy* **2008**, 7, 557-568.
206. Graham, F. L.; Smiley, J.; Russell, W. C.; Nairn, R., Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *The Journal of general virology* **1977**, 36, 59-74.
207. Alwine, J. C., Transient gene expression control: effects of transfected DNA stability and trans-activation by viral early proteins. *Molecular and cellular biology* **1985**, 5, 1034-42.
208. Kovalevich, J.; Langford, D., Considerations for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **2013**, 1078, 9-21.
209. Biedler, J. L.; Roffler-Tarlov, S.; Schachner, M.; Freedman, L. S., Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones. *Cancer research* **1978**, 38, 3751-7.
210. Korecka, J. A.; van Kesteren, R. E.; Blaas, E.; Spitzer, S. O.; Kamstra, J. H.; Smit, A. B.; Swaab, D. F.; Verhaagen, J.; Bossers, K., Phenotypic characterization of retinoic acid differentiated SH-SY5Y cells by transcriptional profiling. *PloS one* **2013**, 8, e63862.
211. Kume, T.; Kawato, Y.; Osakada, F.; Izumi, Y.; Katsuki, H.; Nakagawa, T.; Kaneko, S.; Niidome, T.; Takada-Takatori, Y.; Akaike, A., Dibutyryl cyclic AMP induces differentiation of human neuroblastoma SH-SY5Y cells into a noradrenergic phenotype. *Neuroscience letters* **2008**, 443, 199-203.
212. Arun, P.; Madhavarao, C. N.; Moffett, J. R.; Namboodiri, A. M., Antipsychotic drugs increase N-acetylaspartate and N-acetylaspartylglutamate in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Journal of neurochemistry* **2008**, 106, 1669-80.
213. Gould, J.; Reeve, H. L.; Vaughan, P. F.; Peers, C., Nicotinic acetylcholine receptors in human neuroblastoma (SH-SY5Y) cells. *Neuroscience letters* **1992**, 145, 201-4.
214. Reeve, H. L.; Vaughan, P. F.; Peers, C., Glibenclamide inhibits a voltage-gated K⁺ current in the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y. *Neuroscience letters* **1992**, 135, 37-40.
215. Reuveny, E.; Narahashi, T., Two types of high voltage-activated calcium channels in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Brain research* **1993**, 603, 64-73.
216. Larsson, K. P.; Hansen, A. J.; Dissing, S., The human SH-SY5Y neuroblastoma cell-line expresses a functional P2X7 purinoceptor that modulates voltage-dependent Ca²⁺ channel function. *Journal of neurochemistry* **2002**, 83, 285-98.
217. Kazmi, S. M.; Mishra, R. K., Opioid receptors in human neuroblastoma SH-SY5Y cells: evidence for distinct morphine (mu) and enkephalin (delta) binding sites. *Biochemical and biophysical research communications* **1986**, 137, 813-20.
218. Yáñez, M.; Galán, L.; Matías-Guiu, J.; Vela, A.; Guerrero, A.; García, A. G., CSF from amyotrophic lateral sclerosis patients produces glutamate independent death of rat motor brain cortical neurons: protection by resveratrol but not riluzole. *Brain research* **2011**, 1423, 77-86.

219. McAvoy, T.; Nairn, A. C., Serine/threonine protein phosphatase assays. *Current protocols in molecular biology* **2010**, Chapter 18, Unit 18.18.
220. Plaimee, P.; Weerapreeyakul, N.; Barusrux, S.; Johns, N. P., Melatonin potentiates cisplatin-induced apoptosis and cell cycle arrest in human lung adenocarcinoma cells. *Cell proliferation* **2015**, *48*, 67-77.
221. Maldifassi, M. C.; Atienza, G.; Arnalich, F.; López-Collazo, E.; Cedillo, J. L.; Martín-Sánchez, C.; Bordas, A.; Renart, J.; Montiel, C., A new IRAK-M-mediated mechanism implicated in the anti-inflammatory effect of nicotine via $\alpha 7$ nicotinic receptors in human macrophages. *PloS one* **2014**, *9*, e108397.
222. Maldifassi, M. C.; Martín-Sánchez, C.; Atienza, G.; Cedillo, J. L.; Arnalich, F.; Bordas, A.; Zafra, F.; Giménez, C.; Extremera, M.; Renart, J.; Montiel, C., Interaction of the $\alpha 7$ -nicotinic subunit with its human-specific duplicated dup $\alpha 7$ isoform in mammalian cells: Relevance in human inflammatory responses. *The Journal of biological chemistry* **2018**, *293*, 13874-13888.
223. Kiely, M.; Kiely, P. A., PP2A: The Wolf in Sheep's Clothing? *Cancers* **2015**, *7*, 648-69.
224. Xing, Y.; Li, Z.; Chen, Y.; Stock, J. B.; Jeffrey, P. D.; Shi, Y., Structural mechanism of demethylation and inactivation of protein phosphatase 2A. *Cell* **2008**, *133*, 154-63.
225. Colby, D. A.; Chamberlin, A. R., Pharmacophore identification: the case of the ser/thr protein phosphatase inhibitors. *Mini reviews in medicinal chemistry* **2006**, *6*, 657-65.
226. Maynes, J. T.; Bateman, K. S.; Cherney, M. M.; Das, A. K.; Luu, H. A.; Holmes, C. F.; James, M. N., Crystal structure of the tumor-promoter okadaic acid bound to protein phosphatase-1. *The Journal of biological chemistry* **2001**, *276*, 44078-82.
227. Dounay, A. B.; Forsyth, C. J., Okadaic acid: the archetypal serine/threonine protein phosphatase inhibitor. *Current medicinal chemistry* **2002**, *9*, 1939-80.
228. Twiner, M. J.; Doucette, G. J.; Pang, Y.; Fang, C.; Forsyth, C. J.; Miles, C. O., Structure-Activity Relationship Studies Using Natural and Synthetic Okadaic Acid/Dinophysistoxin Toxins. *Mar Drugs* **2016**, *14*.
229. Takai, A.; Murata, M.; Torigoe, K.; Isobe, M.; Mieskes, G.; Yasumoto, T., Inhibitory effect of okadaic acid derivatives on protein phosphatases. A study on structure-affinity relationship. *The Biochemical journal* **1992**, *284* (Pt 2), 539-44.
230. Huhn, J.; Jeffrey, P. D.; Larsen, K.; Rundberget, T.; Rise, F.; Cox, N. R.; Arcus, V.; Shi, Y.; Miles, C. O., A structural basis for the reduced toxicity of dinophysistoxin-2. *Chemical research in toxicology* **2009**, *22*, 1782-6.
231. Lawhorn, B. G.; Boga, S. B.; Wolkenberg, S. E.; Colby, D. A.; Gauss, C. M.; Swingle, M. R.; Amable, L.; Honkanen, R. E.; Boger, D. L., Total synthesis and evaluation of cytostatin, its C10-C11 diastereomers, and additional key analogues: impact on PP2A inhibition. *J Am Chem Soc* **2006**, *128*, 16720-32.
232. Swingle, M. R.; Amable, L.; Lawhorn, B. G.; Buck, S. B.; Burke, C. P.; Ratti, P.; Fischer, K. L.; Boger, D. L.; Honkanen, R. E., Structure-activity relationship studies of fostriecin, cytostatin, and key analogs, with PP1, PP2A, PP5, and($\beta 12$ - $\beta 13$)-chimeras (PP1/PP2A and PP5/PP2A), provide further insight into the inhibitory actions of fostriecin family inhibitors. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **2009**, *331*, 45-53.
233. Cruz, P. G.; Daranas, A. H.; Fernández, J. J.; Norte, M., 19-epi-okadaic acid, a novel protein phosphatase inhibitor with enhanced selectivity. *Organic letters* **2007**, *9*, 3045-8.

234. Nishiwaki, S.; Fujiki, H.; Suganuma, M.; Furuya-Suguri, H.; Matsushima, R.; Iida, Y.; Ojika, M.; Yamada, K.; Uemura, D.; Yasumoto, T.; et al., Structure-activity relationship within a series of okadaic acid derivatives. *Carcinogenesis* **1990**, *11*, 1837-41.
235. Kita, M.; Kuramoto, M.; Chiba, T.; Yamada, A.; Yamada, N.; Ishida, T.; Haino, T.; Yamada, K.; Ijuin, Y.; Ohno, O.; Uemura, D. In *Structure-activity relationship of okadaic acid, a potent protein phosphatases PP1 and PP2A inhibitor: 24-epi-okadaic acid and a 18-membered lactone analog* 2008.
236. Sasaki, K.; Murata, M.; Yasumoto, T.; Mieskes, G.; Takai, A., Affinity of okadaic acid to type-1 and type-2A protein phosphatases is markedly reduced by oxidation of its 27-hydroxyl group. *The Biochemical journal* **1994**, *298* (Pt 2), 259-62.
237. Ichikawa, Y.; Isobe, M.; Bai, D.-L.; Goto, T., Synthesis of a marine polyether toxin, okadaic acid [1]11Full Paper corresponding to the communications, M. Isobe, Y. Ichikawa and T. Goto, *Tetrahedron Lett.*, *26*, 5199 (1985); M. Isobe, Y. Ichikawa, D-L. Bai and T. Goto, *Tetrahedron Lett.*, *26*, 5203 (1985). — strategy and synthesis of segment a. *Tetrahedron* **1987**, *43*, 4737-4748.
238. Ichikawa, Y.; Isobe, M.; Masaki, H.; Kawai, T.; Goto, T., Synthesis of a marine polyether toxin, okadaic acid (3)11For the part (2) see the previous paper of this issue, *Tetrahedron*, *45*, 0000 (1987). — synthesis of segment c. *Tetrahedron* **1987**, *43*, 4759-4766.
239. Forsyth, C. J.; Sabes, S. F.; Urbanek, R. A., An Efficient Total Synthesis of Okadaic Acid. *Journal of the American Chemical Society* **1997**, *119*, 8381-8382.
240. Ley, S. V.; Humphries, A. C.; Eick, H.; Downham, R.; Ross, A. S.; Boyce, R.; Pavay, J. B. J.; Pietruszka, J. In *Total Synthesis of the Protein Phosphatase Inhibitor Okadaic Acid* 1999.
241. Markó, I. E.; Dobbs, A. P.; Scheirrmann, V.; Chellé, F.; Bayston, D. J., Concise and stereocontrolled assembly of substituted dihydropyrans. Synthetic studies towards the trans-dioxadecalin subunit of okadaic acid. *Tetrahedron Letters* **1997**, *38*, 2899-2902.
242. Smith, A. B.; Lin, Q.; Doughty, V. A.; Zhuang, L.; McBriar, M. D.; Kerns, J. K.; Boldi, A. M.; Murase, N.; Moser, W. H.; Brook, C. S.; Bennett, C. S.; Nakayama, K.; Sobukawa, M.; Lee Trout, R. E., Spongipyran synthetic studies. Total synthesis of (+)-spongistatin 2. *Tetrahedron* **2009**, *65*, 6470-6488.
243. Colobert, F.; Mazery, R. D.; Solladié, G.; Carreño, M. C., First Enantioselective Total Synthesis of (–)-Centrolobine. *Organic letters* **2002**, *4*, 1723-1725.
244. Liu, Q.; Guo, T.; Li, F.; Li, D., Concise synthesis of a new triterpenoid saponin from the roots of *Gypsophila oldhamiana* and its derivatives as α -glucosidase inhibitors. *New Journal of Chemistry* **2016**, *40*, 9537-9549.
245. Bauer, A., Story of Eribulin Mesylate: Development of the Longest Drug Synthesis. In *Synthesis of Heterocycles in Contemporary Medicinal Chemistry*, Časar, Z., Ed. Springer International Publishing: Cham, 2016; pp 209-270.
246. Saunders, N. R.; Dreifuss, J. J.; Dziegielewska, K. M.; Johansson, P. A.; Habgood, M. D.; Møllgård, K.; Bauer, H. C., The rights and wrongs of blood-brain barrier permeability studies: a walk through 100 years of history. *Frontiers in neuroscience* **2014**, *8*, 404.
247. Pardridge, W. M., The blood-brain barrier: bottleneck in brain drug development. *NeuroRx : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* **2005**, *2*, 3-14.
248. Stanimirovic, D. B.; Bani-Yaghoub, M.; Perkins, M.; Haqqani, A. S., Blood-brain barrier models: in vitro to in vivo translation in preclinical development of CNS-targeting biotherapeutics. *Expert opinion on drug discovery* **2015**, *10*, 141-55.
249. Clark, D. E., In silico prediction of blood-brain barrier permeation. *Drug discovery today* **2003**, *8*, 927-33.

250. Abbott, N. J.; Dolman, D. E.; Patabendige, A. K., Assays to predict drug permeation across the blood-brain barrier, and distribution to brain. *Current drug metabolism* **2008**, *9*, 901-10.
251. Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J., Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced drug delivery reviews* **2001**, *46*, 3-26.
252. Bickerton, G. R.; Paolini, G. V.; Besnard, J.; Muresan, S.; Hopkins, A. L., Quantifying the chemical beauty of drugs. *Nature chemistry* **2012**, *4*, 90-8.
253. Wager, T. T.; Hou, X.; Verhoest, P. R.; Villalobos, A., Moving beyond rules: the development of a central nervous system multiparameter optimization (CNS MPO) approach to enable alignment of druglike properties. *ACS chemical neuroscience* **2010**, *1*, 435-49.
254. Pajouhesh, H.; Lenz, G. R., Medicinal chemical properties of successful central nervous system drugs. *NeuroRx : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* **2005**, *2*, 541-53.
255. van de Waterbeemd, H.; Camenisch, G.; Folkers, G.; Chretien, J. R.; Raevsky, O. A., Estimation of blood-brain barrier crossing of drugs using molecular size and shape, and H-bonding descriptors. *Journal of drug targeting* **1998**, *6*, 151-65.
256. Baykov, A. A.; Evtushenko, O. A.; Avaeva, S. M., A malachite green procedure for orthophosphate determination and its use in alkaline phosphatase-based enzyme immunoassay. *Analytical biochemistry* **1988**, *171*, 266-70.
257. Louche, A.; Salcedo, S. P.; Bigot, S., Protein-Protein Interactions: Pull-Down Assays. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **2017**, *1615*, 247-255.
258. Letourneux, C.; Rocher, G.; Porteu, F., B56-containing PP2A dephosphorylate ERK and their activity is controlled by the early gene IEX-1 and ERK. *The EMBO journal* **2006**, *25*, 727-38.
259. Zhang, L.; Wang, H. D.; Ji, X. J.; Cong, Z. X.; Zhu, J. H.; Zhou, Y., FTY720 for cancer therapy (Review). *Oncology reports* **2013**, *30*, 2571-8.
260. Saddoughi, S. A.; Gencer, S.; Peterson, Y. K.; Ward, K. E.; Mukhopadhyay, A.; Oaks, J.; Bielawski, J.; Szulc, Z. M.; Thomas, R. J.; Selvam, S. P.; Senkal, C. E.; Garrett-Mayer, E.; De Palma, R. M.; Fedarovich, D.; Liu, A.; Habib, A. A.; Stahelin, R. V.; Perrotti, D.; Ogretmen, B., Sphingosine analogue drug FTY720 targets I2PP2A/SET and mediates lung tumour suppression via activation of PP2A-RIPK1-dependent necroptosis. *EMBO molecular medicine* **2013**, *5*, 105-21.
261. Rahman, M. M.; Prunte, L.; Lebender, L. F.; Patel, B. S.; Gelissen, I.; Hansbro, P. M.; Morris, J. C.; Clark, A. R.; Verrills, N. M.; Ammit, A. J., The phosphorylated form of FTY720 activates PP2A, represses inflammation and is devoid of S1P agonism in A549 lung epithelial cells. *Scientific reports* **2016**, *6*, 37297.
262. White, C.; Alshaker, H.; Cooper, C.; Winkler, M.; Pchejetski, D., The emerging role of FTY720 (Fingolimod) in cancer treatment. *Oncotarget* **2016**, *7*, 23106-27.
263. Zhang, J.; Kamdar, O.; Le, W.; Rosen, G. D.; Upadhyay, D., Nicotine induces resistance to chemotherapy by modulating mitochondrial signaling in lung cancer. *American journal of respiratory cell and molecular biology* **2009**, *40*, 135-46.
264. Tsurutani, J.; Castillo, S. S.; Brognard, J.; Granville, C. A.; Zhang, C.; Gills, J. J.; Sayyah, J.; Dennis, P. A., Tobacco components stimulate Akt-dependent proliferation and NFkappaB-dependent survival in lung cancer cells. *Carcinogenesis* **2005**, *26*, 1182-95.
265. Dasgupta, P.; Kinkade, R.; Joshi, B.; Decook, C.; Haura, E.; Chellappan, S., Nicotine inhibits apoptosis induced by chemotherapeutic drugs by up-regulating XIAP and survivin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2006**, *103*, 6332-7.

266. Warren, G. W.; Romano, M. A.; Kudrimoti, M. R.; Randall, M. E.; McGarry, R. C.; Singh, A. K.; Rangnekar, V. M., Nicotinic modulation of therapeutic response in vitro and in vivo. *International journal of cancer* **2012**, *131*, 2519-2527.
267. Zhang, Q.; Claret, F. X., Phosphatases: the new brakes for cancer development? *Enzyme research* **2012**, *2012*, 659649.
268. Sablina, A. A.; Hector, M.; Colpaert, N.; Hahn, W. C., Identification of PP2A complexes and pathways involved in cell transformation. *Cancer research* **2010**, *70*, 10474-84.
269. Silverstein, A. M.; Barrow, C. A.; Davis, A. J.; Mumby, M. C., Actions of PP2A on the MAP kinase pathway and apoptosis are mediated by distinct regulatory subunits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2002**, *99*, 4221-6.
270. Dong, Q. Z.; Wang, Y.; Dong, X. J.; Li, Z. X.; Tang, Z. P.; Cui, Q. Z.; Wang, E. H., CIP2A is overexpressed in non-small cell lung cancer and correlates with poor prognosis. *Annals of surgical oncology* **2011**, *18*, 857-65.
271. Shouse, G. P.; Nobumori, Y.; Liu, X., A B56gamma mutation in lung cancer disrupts the p53-dependent tumor-suppressor function of protein phosphatase 2A. *Oncogene* **2010**, *29*, 3933-41.
272. Tian, L.; Zhang, X.; Haesen, D.; Bravo, J.; Fominaya, J.; Choquet, S.; Zini, J. M.; Loisel, S.; Waelkens, E.; Janssens, V.; Rebollo, A., Identification of PP2A/Set Binding Sites and Design of Interacting Peptides with Potential Clinical Applications. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics* **2018**, *24*, 479-488.
273. De Palma, R. M.; Parnham, S. R.; Li, Y.; Oaks, J. J.; Peterson, Y. K.; Szulc, Z. M.; Roth, B. M.; Xing, Y.; Ogretmen, B., The NMR-based characterization of the FTY720-SET complex reveals an alternative mechanism for the attenuation of the inhibitory SET-PP2A interaction. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **2019**, *33*, 7647-7666.
274. Kim, E. J.; Kim, H. J.; Park, M. K.; Kang, G. J.; Byun, H. J.; Lee, H.; Lee, C. H., Cardamonin Suppresses TGF- β 1-Induced Epithelial Mesenchymal Transition via Restoring Protein Phosphatase 2A Expression. *Biomolecules & therapeutics* **2015**, *23*, 141-8.
275. Rincón, R.; Cristóbal, I.; Zazo, S.; Arpí, O.; Menéndez, S.; Manso, R.; Lluch, A.; Eroles, P.; Rovira, A.; Albanell, J.; García-Foncillas, J.; Madoz-Gúrpide, J.; Rojo, F., PP2A inhibition determines poor outcome and doxorubicin resistance in early breast cancer and its activation shows promising therapeutic effects. *Oncotarget* **2015**, *6*, 4299-314.
276. Cristóbal, I.; González-Alonso, P.; Daoud, L.; Solano, E.; Torrejón, B.; Manso, R.; Madoz-Gúrpide, J.; Rojo, F.; García-Foncillas, J., Activation of the Tumor Suppressor PP2A Emerges as a Potential Therapeutic Strategy for Treating Prostate Cancer. *Mar Drugs* **2015**, *13*, 3276-86.
277. Cristóbal, I.; Madoz-Gúrpide, J.; Manso, R.; González-Alonso, P.; Rojo, F.; García-Foncillas, J., Potential anti-tumor effects of FTY720 associated with PP2A activation: a brief review. *Current medical research and opinion* **2016**, *32*, 1137-41.
278. Tohmé, R.; Izadmehr, S.; Gandhe, S.; Tabaro, G.; Vallabhaneni, S.; Thomas, A.; Vasireddi, N.; Dhawan, N. S.; Ma'ayan, A.; Sharma, N.; Galsky, M. D.; Ohlmeyer, M.; Sangodkar, J.; Narla, G., Direct activation of PP2A for the treatment of tyrosine kinase inhibitor-resistant lung adenocarcinoma. *JCI insight* **2019**, *4*.
279. Denu, J. M.; Lohse, D. L.; Vijayalakshmi, J.; Saper, M. A.; Dixon, J. E., Visualization of intermediate and transition-state structures in protein-tyrosine phosphatase catalysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1996**, *93*, 2493-8.

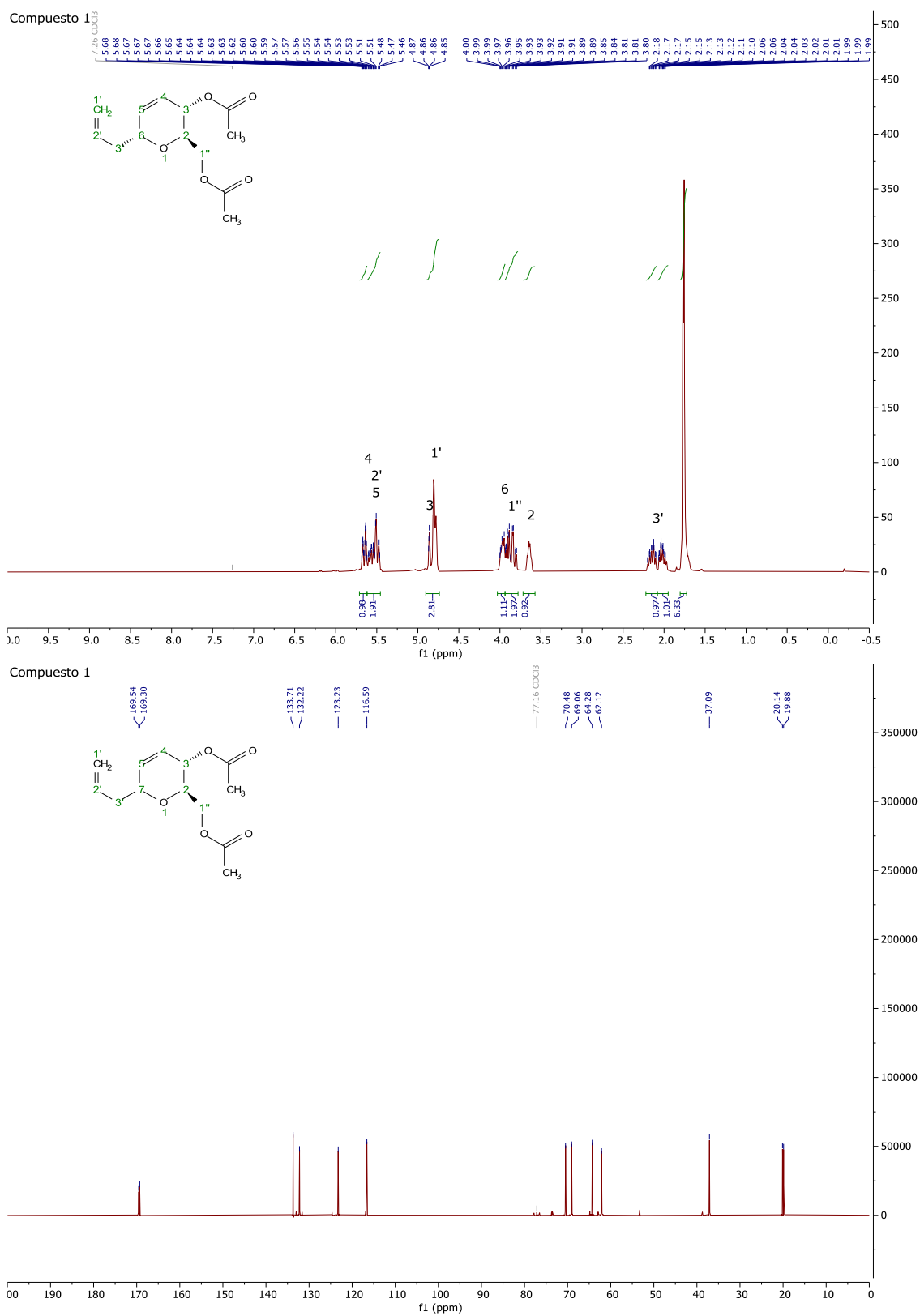
280. Swingle, M.; Ni, L.; Honkanen, R. E., Small-molecule inhibitors of ser/thr protein phosphatases: specificity, use and common forms of abuse. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **2007**, *365*, 23-38.
281. Takeuchi, T.; Takahashi, N.; Ishi, K.; Kusayanagi, T.; Kuramochi, K.; Sugawara, F., Antitumor antibiotic fostriecin covalently binds to cysteine-269 residue of protein phosphatase 2A catalytic subunit in mammalian cells. *Bioorganic & medicinal chemistry* **2009**, *17*, 8113-22.
282. Kawada, M.; Amemiya, M.; Ishizuka, M.; Takeuchi, T., Cytostatin, an inhibitor of cell adhesion to extracellular matrix, selectively inhibits protein phosphatase 2A. *Biochimica et biophysica acta* **1999**, *1452*, 209-17.
283. Cruz, P. G.; Norte, M.; Creus, A. H.; Fernández, J. J.; Daranas, A. H., Self-association of okadaic acid: structural and pharmacological significance. *Mar Drugs* **2013**, *11*, 1866-1877.
284. Asam, K.; Staniszewski, A.; Zhang, H.; Melideo, S. L.; Mazzeo, A.; Voronkov, M.; Huber, K. L.; Pérez, E.; Stock, M.; Stock, J. B.; Arancio, O.; Nicholls, R. E., Eicosanoyl-5-hydroxytryptamide (EHT) prevents Alzheimer's disease-related cognitive and electrophysiological impairments in mice exposed to elevated concentrations of oligomeric beta-amyloid. *PloS one* **2017**, *12*, e0189413.
285. Corcoran, N. M.; Martin, D.; Hutter-Paier, B.; Windisch, M.; Nguyen, T.; Nheu, L.; Sundstrom, L. E.; Costello, A. J.; Hovens, C. M., Sodium selenate specifically activates PP2A phosphatase, dephosphorylates tau and reverses memory deficits in an Alzheimer's disease model. *Journal of clinical neuroscience : official journal of the Neurosurgical Society of Australasia* **2010**, *17*, 1025-33.
286. van Eersel, J.; Ke, Y. D.; Liu, X.; Delerue, F.; Kril, J. J.; Götz, J.; Ittner, L. M., Sodium selenate mitigates tau pathology, neurodegeneration, and functional deficits in Alzheimer's disease models. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2010**, *107*, 13888-93.
287. Malpas, C. B.; Vivash, L.; Genc, S.; Saling, M. M.; Desmond, P.; Steward, C.; Hicks, R. J.; Callahan, J.; Brodtmann, A.; Collins, S.; Macfarlane, S.; Corcoran, N. M.; Hovens, C. M.; Velakoulis, D.; O'Brien, T. J., A Phase IIa Randomized Control Trial of VEL015 (Sodium Selenate) in Mild-Moderate Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* **2016**, *54*, 223-32.
288. Williams, A. P.; Garner, E. F.; Waters, A. M.; Stafman, L. L.; Aye, J. M.; Markert, H.; Stewart, J. E.; Beierle, E. A., Investigation of PP2A and Its Endogenous Inhibitors in Neuroblastoma Cell Survival and Tumor Growth. *Translational oncology* **2019**, *12*, 84-95.
289. Rajasekar, N.; Dwivedi, S.; Tota, S. K.; Kamat, P. K.; Hanif, K.; Nath, C.; Shukla, R., Neuroprotective effect of curcumin on okadaic acid induced memory impairment in mice. *European journal of pharmacology* **2013**, *715*, 381-94.
290. Sun, L.; Liu, S. Y.; Zhou, X. W.; Wang, X. C.; Liu, R.; Wang, Q.; Wang, J. Z., Inhibition of protein phosphatase 2A- and protein phosphatase 1-induced tau hyperphosphorylation and impairment of spatial memory retention in rats. *Neuroscience* **2003**, *118*, 1175-82.
291. Pérez, M.; Hernández, F.; Gómez-Ramos, A.; Smith, M.; Perry, G.; Avila, J., Formation of aberrant phosphotau fibrillar polymers in neural cultured cells. *European journal of biochemistry* **2002**, *269*, 1484-9.
292. Takasugi, N.; Sasaki, T.; Ebinuma, I.; Osawa, S.; Isshiki, H.; Takeo, K.; Tomita, T.; Iwatsubo, T., FTY720/fingolimod, a sphingosine analogue, reduces amyloid- β production in neurons. *PloS one* **2013**, *8*, e64050.
293. Romero, A.; Egea, J.; García, A. G.; López, M. G., Synergistic neuroprotective effect of combined low concentrations of galantamine and melatonin against oxidative stress in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Journal of pineal research* **2010**, *49*, 141-8.

294. Chen, L.; Liu, L.; Yin, J.; Luo, Y.; Huang, S., Hydrogen peroxide-induced neuronal apoptosis is associated with inhibition of protein phosphatase 2A and 5, leading to activation of MAPK pathway. *The international journal of biochemistry & cell biology* **2009**, *41*, 1284-95.
295. Wang, Y.; Liu, J.; Chen, M.; Du, T.; Duan, C.; Gao, G.; Yang, H., The novel mechanism of rotenone-induced α -synuclein phosphorylation via reduced protein phosphatase 2A activity. *The international journal of biochemistry & cell biology* **2016**, *75*, 34-44.
296. Yang, X.; Yang, Y.; Fu, Z.; Li, Y.; Feng, J.; Luo, J.; Zhang, Q.; Wang, Q.; Tian, Q., Melatonin ameliorates Alzheimer-like pathological changes and spatial memory retention impairment induced by calyculin A. *Journal of psychopharmacology (Oxford, England)* **2011**, *25*, 1118-25.
297. Sun, Z. W.; Zhang, L.; Zhu, S. J.; Chen, W. C.; Mei, B., Excitotoxicity effects of glutamate on human neuroblastoma SH-SY5Y cells via oxidative damage. *Neuroscience bulletin* **2010**, *26*, 8-16.
298. Brose, R. D.; Lehmman, E.; Zhang, Y.; Reeves, R. H.; Smith, K. D.; Mattson, M. P., Hydroxyurea attenuates oxidative, metabolic, and excitotoxic stress in rat hippocampal neurons and improves spatial memory in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging* **2018**, *72*, 121-133.
299. Pérez-Otaño, I.; Larsen, R. S.; Wesseling, J. F., Emerging roles of GluN3-containing NMDA receptors in the CNS. *Nature reviews. Neuroscience* **2016**, *17*, 623-35.
300. Augustinack, J. C.; Schneider, A.; Mandelkow, E. M.; Hyman, B. T., Specific tau phosphorylation sites correlate with severity of neuronal cytopathology in Alzheimer's disease. *Acta neuropathologica* **2002**, *103*, 26-35.
301. Wang, J. Z.; Grundke-Iqbal, I.; Iqbal, K., Kinases and phosphatases and tau sites involved in Alzheimer neurofibrillary degeneration. *The European journal of neuroscience* **2007**, *25*, 59-68.
302. Qian, W.; Shi, J.; Yin, X.; Iqbal, K.; Grundke-Iqbal, I.; Gong, C. X.; Liu, F., PP2A regulates tau phosphorylation directly and also indirectly via activating GSK-3 β . *Journal of Alzheimer's disease : JAD* **2010**, *19*, 1221-9.
303. Wang, Y.; Yang, R.; Gu, J.; Yin, X.; Jin, N.; Xie, S.; Wang, Y.; Chang, H.; Qian, W.; Shi, J.; Iqbal, K.; Gong, C. X.; Cheng, C.; Liu, F., Cross talk between PI3K-AKT-GSK-3 β and PP2A pathways determines tau hyperphosphorylation. *Neurobiology of aging* **2015**, *36*, 188-200.
304. Liu, F.; Li, B.; Tung, E.-J.; Grundke-Iqbal, I.; Iqbal, K.; Gong, C.-X., Site-specific effects of tau phosphorylation on its microtubule assembly activity and self-aggregation. *European Journal of Neuroscience* **2007**, *26*, 3429-3436.
305. Alonso, A. D.; Di Clerico, J.; Li, B.; Corbo, C. P.; Alaniz, M. E.; Grundke-Iqbal, I.; Iqbal, K., Phosphorylation of tau at Thr212, Thr231, and Ser262 combined causes neurodegeneration. *The Journal of biological chemistry* **2010**, *285*, 30851-60.
306. Millward, T. A.; Zolnierowicz, S.; Hemmings, B. A., Regulation of protein kinase cascades by protein phosphatase 2A. *Trends in biochemical sciences* **1999**, *24*, 186-91.
307. Kins, S.; Kurosinski, P.; Nitsch, R. M.; Götz, J., Activation of the ERK and JNK signaling pathways caused by neuron-specific inhibition of PP2A in transgenic mice. *The American journal of pathology* **2003**, *163*, 833-43.
308. Sun, J.; Nan, G., The extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway in neurological diseases: A potential therapeutic target (Review). *International journal of molecular medicine* **2017**, *39*, 1338-1346.

ANEXOS

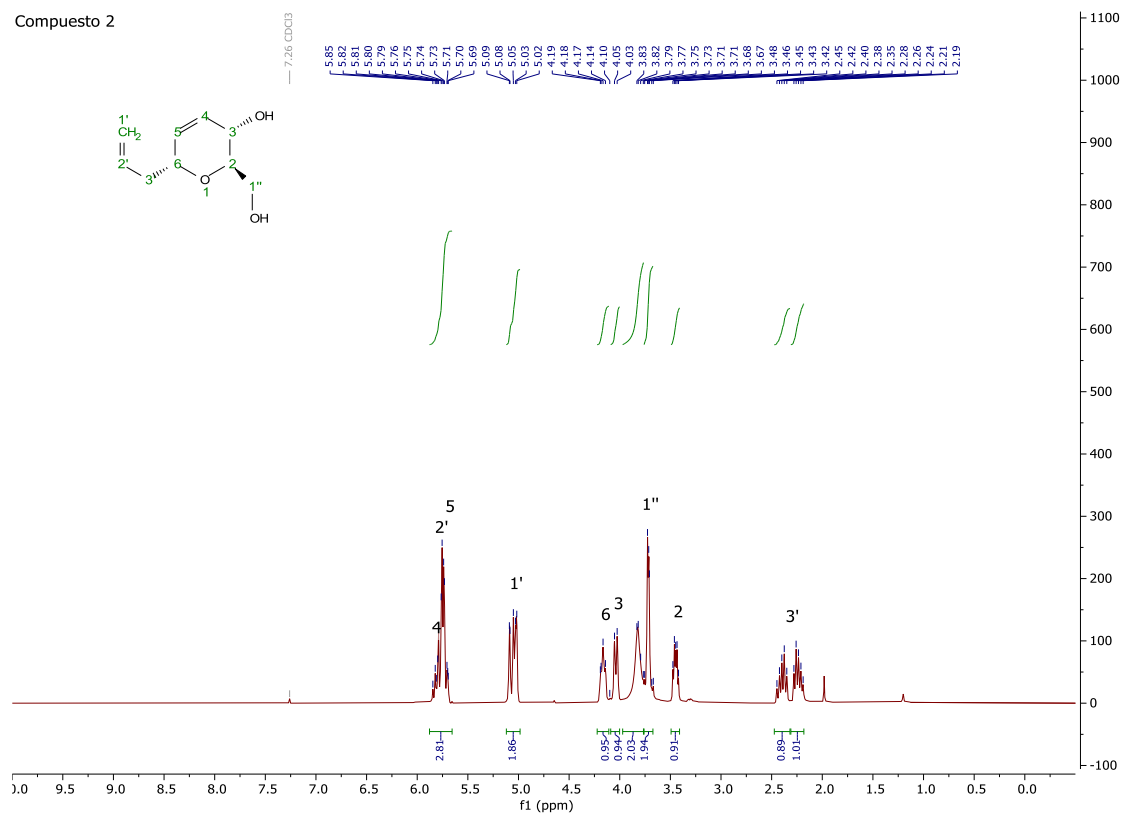
ESPECTROS DE RMN DE ^1H Y DE ^{13}C

1. Acetato de [(2*R*,3*S*,6*R*)-3-acetoxi-6-alil-3,6-dihidro-2*H*-piran-2-il]metilo (1)

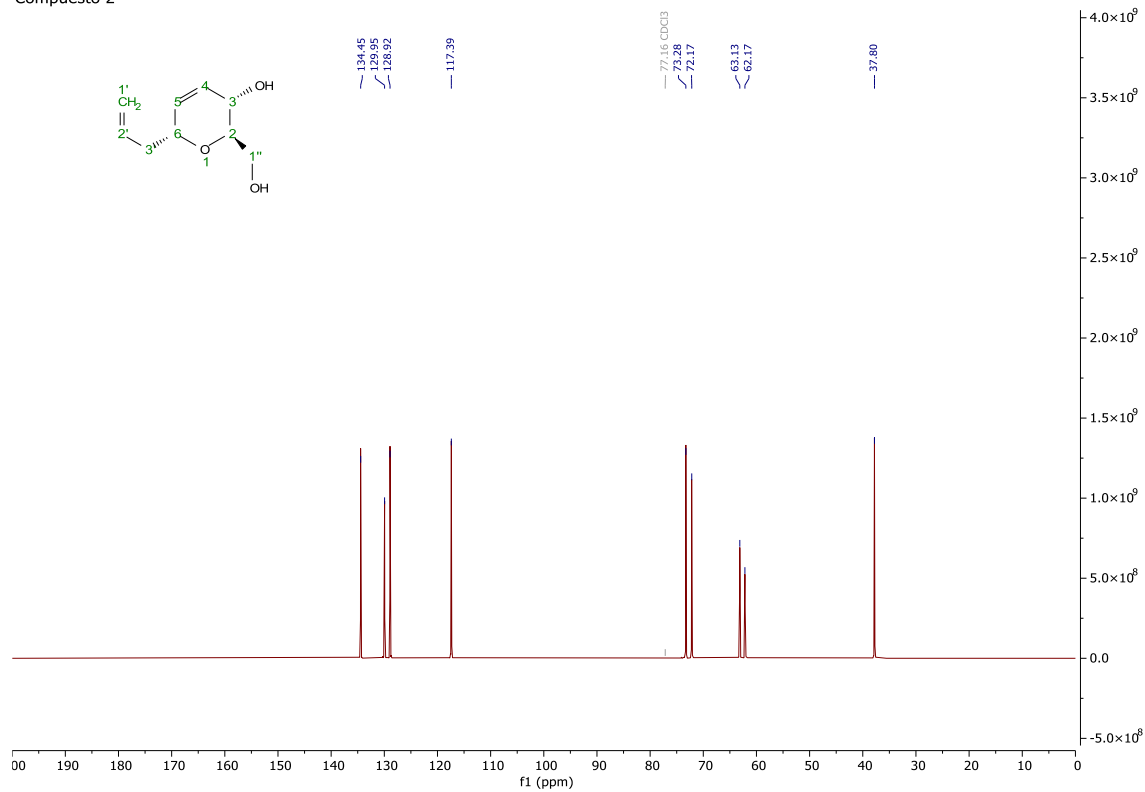


2. (2*R*,3*S*,6*R*)-6-alil-3,6-dihidro-2-(hidroximetil)-3,6-dihidro-2*H*-piran-3-ol (2)

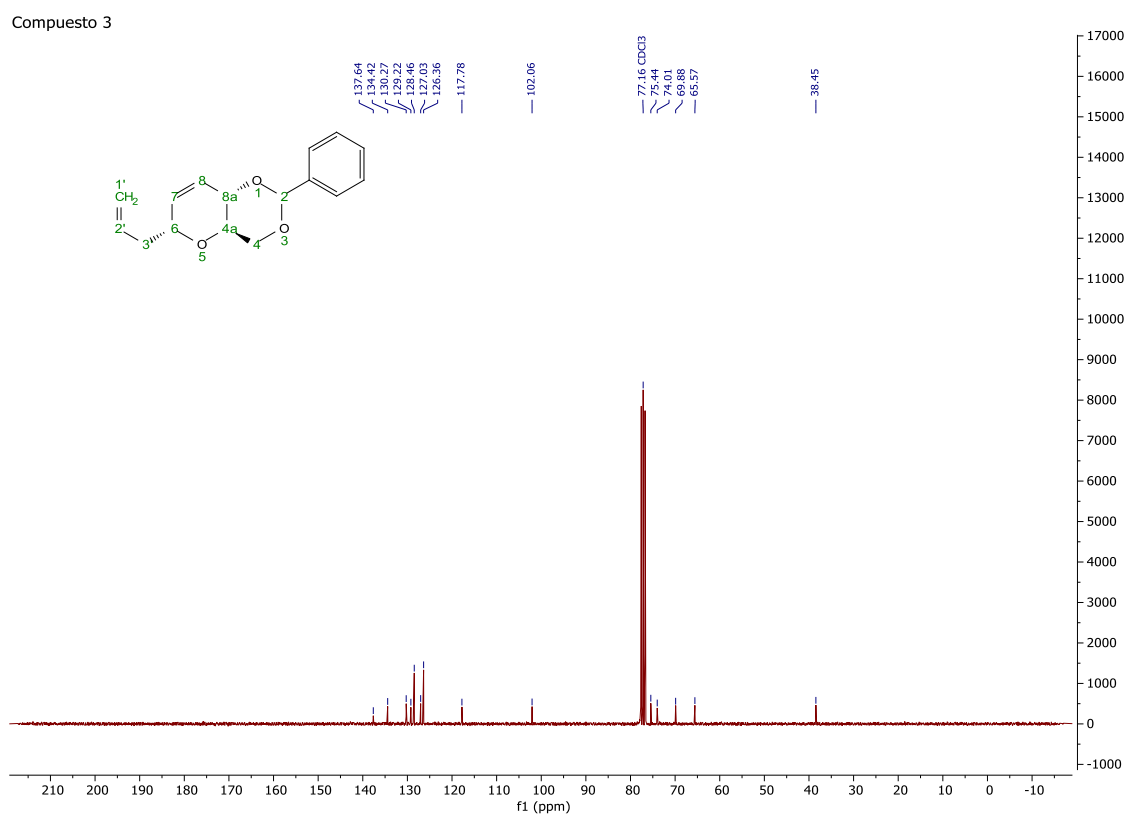
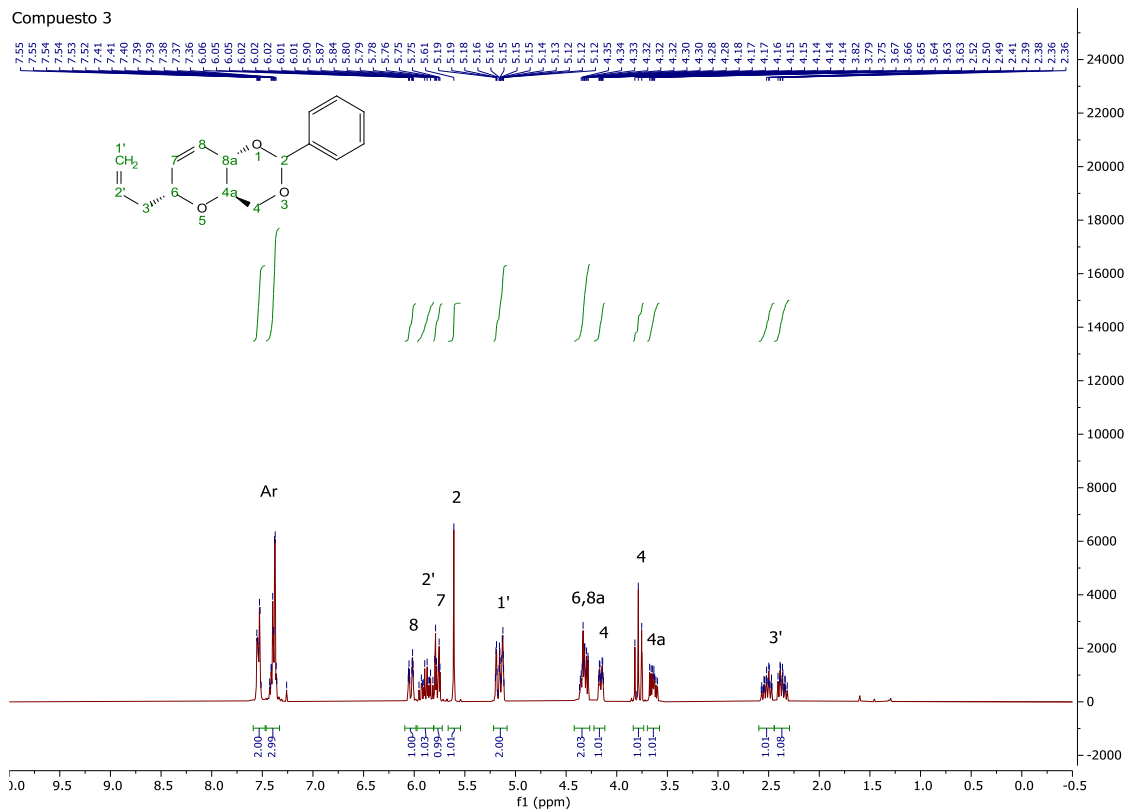
Compuesto 2

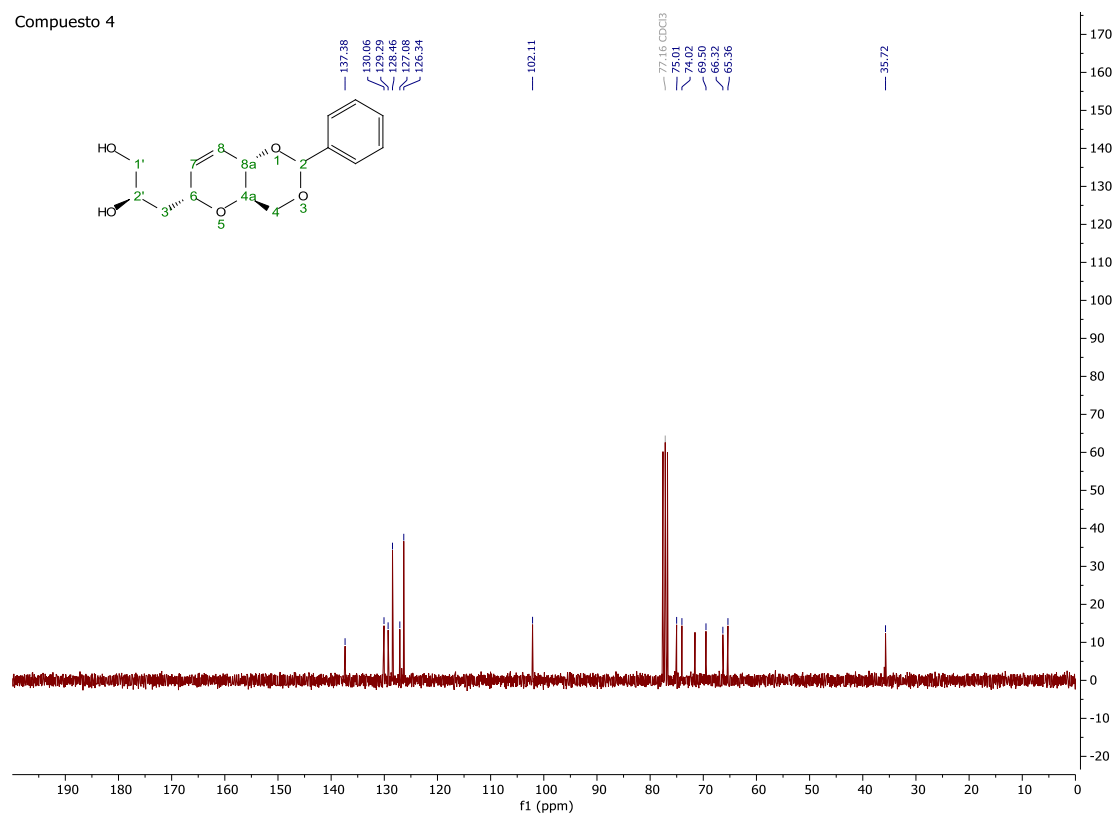
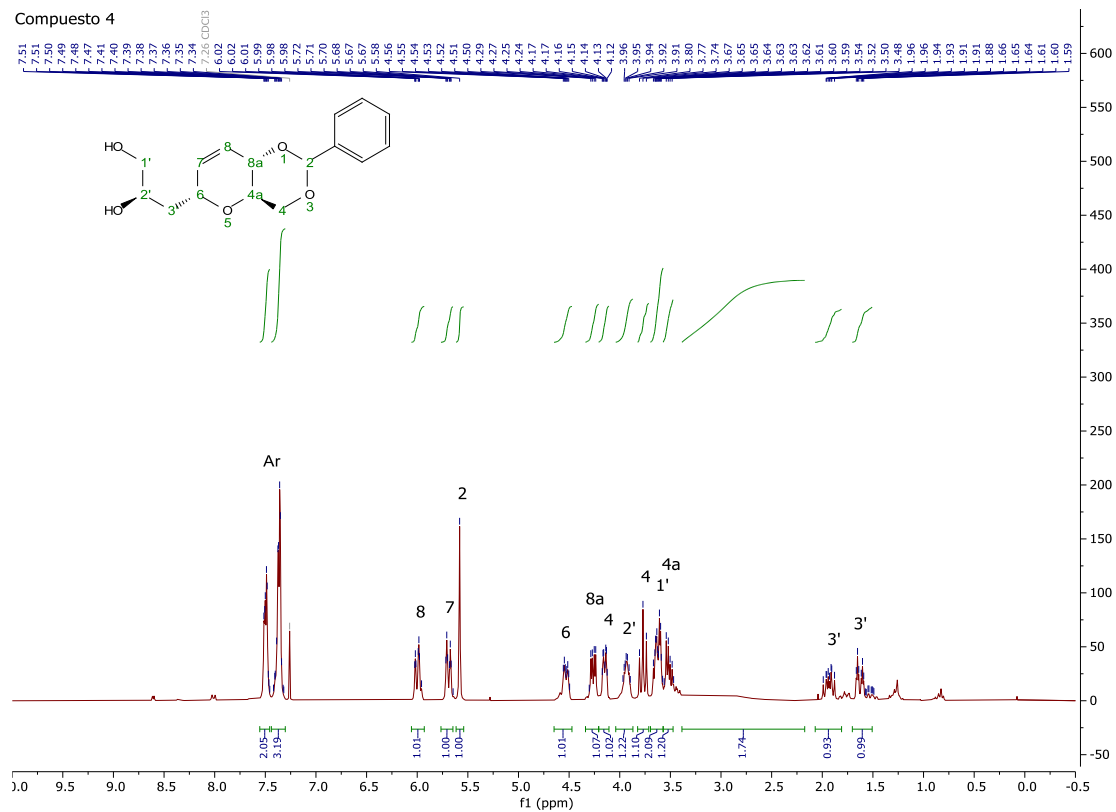


Compuesto 2

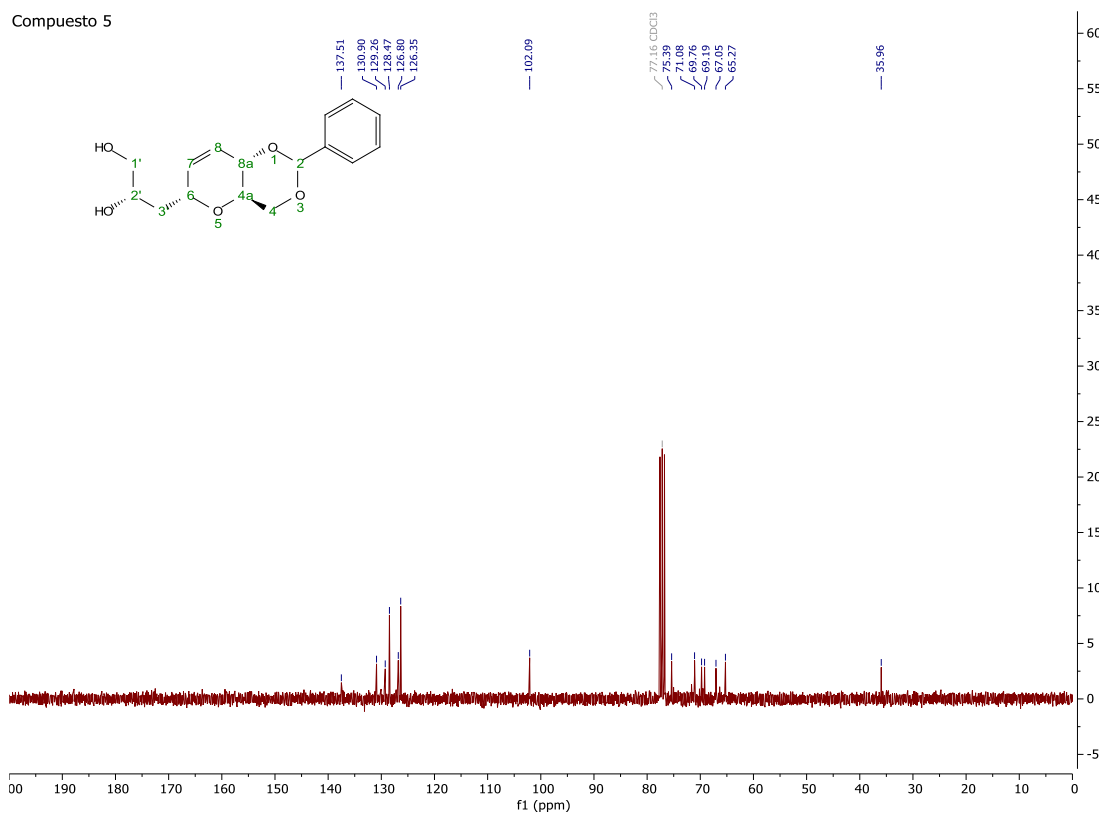
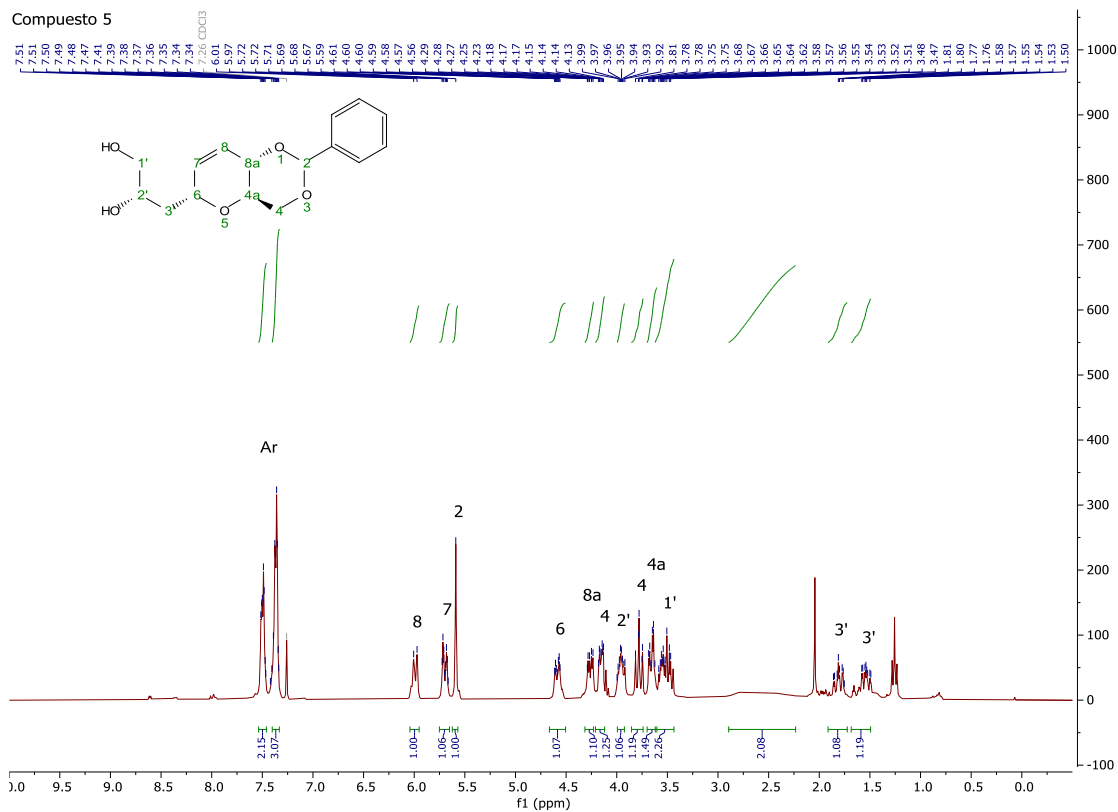


3. (4aR,6R,8aS)-6-alil-2-fenil-4,4a,6,8a-tetrahidropirano[3,2-d][1,3]dioxina (3)



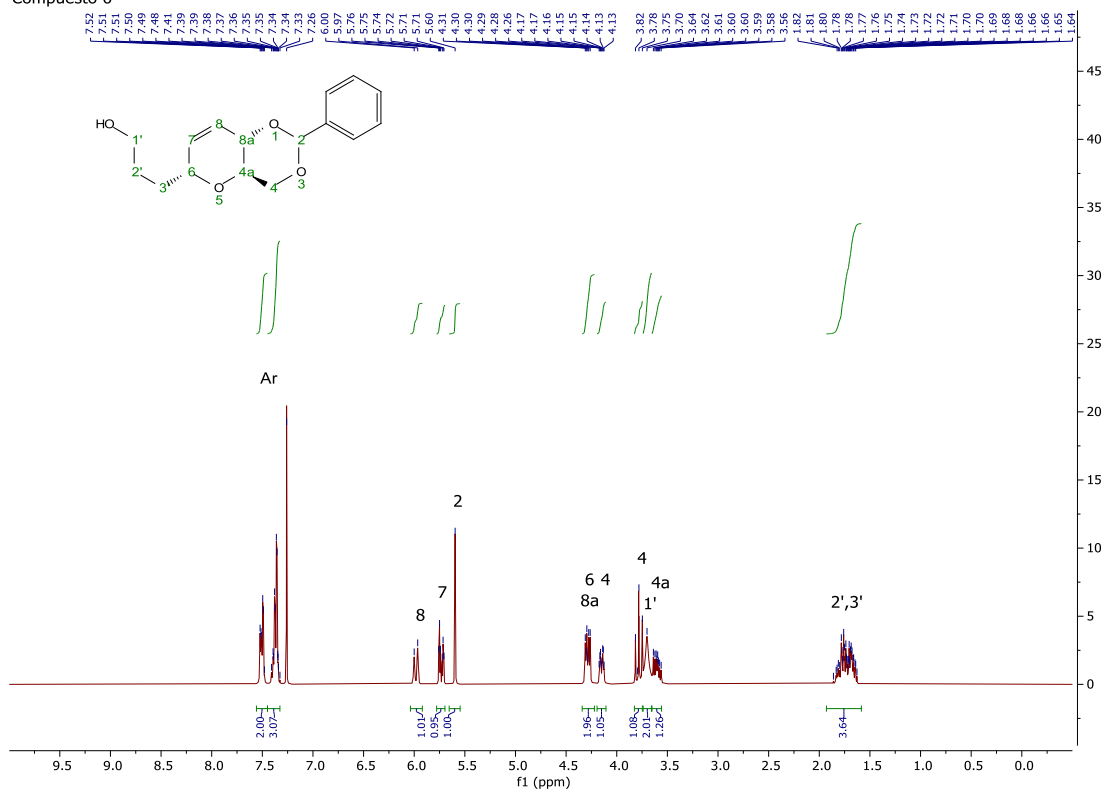
4. (2R)-3-[(4aR,6R,8aS)-2-fenil-4,4a,6,8a-tetrahidropirano[3,2-d][1,3]dioxin-6-il]propan-1,2-diol (4)

5. (2S)-3-[(4aR,6R,8aS)-2-fenil-4,4a,6,8a-tetrahidropirano[3,2-d][1,3]dioxin-6-il]propano-1,2-diol (5)

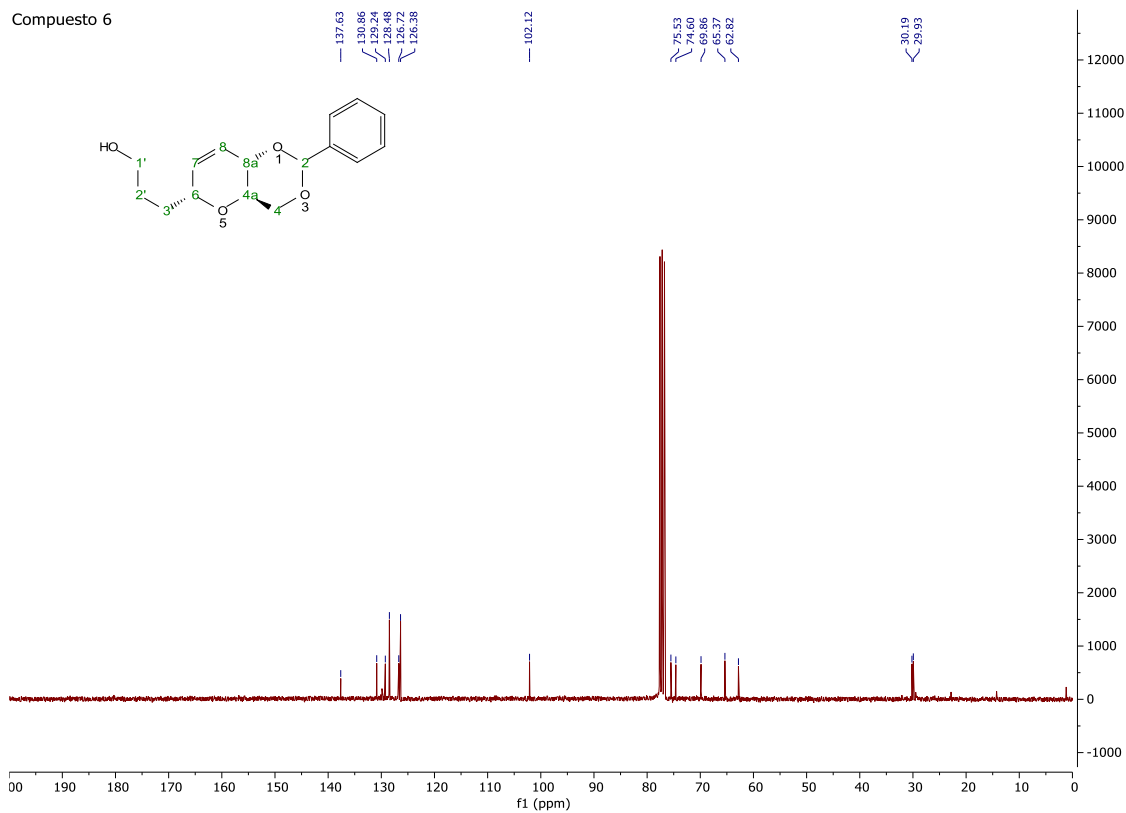


6. 3-[(4*aR*,8*aS*)-2-fenil-4,4*a*,6,8*a*-tetrahidropirano[3,2-*d*][1,3]dioxin-6-il]propan-1-ol (6)

Compuesto 6

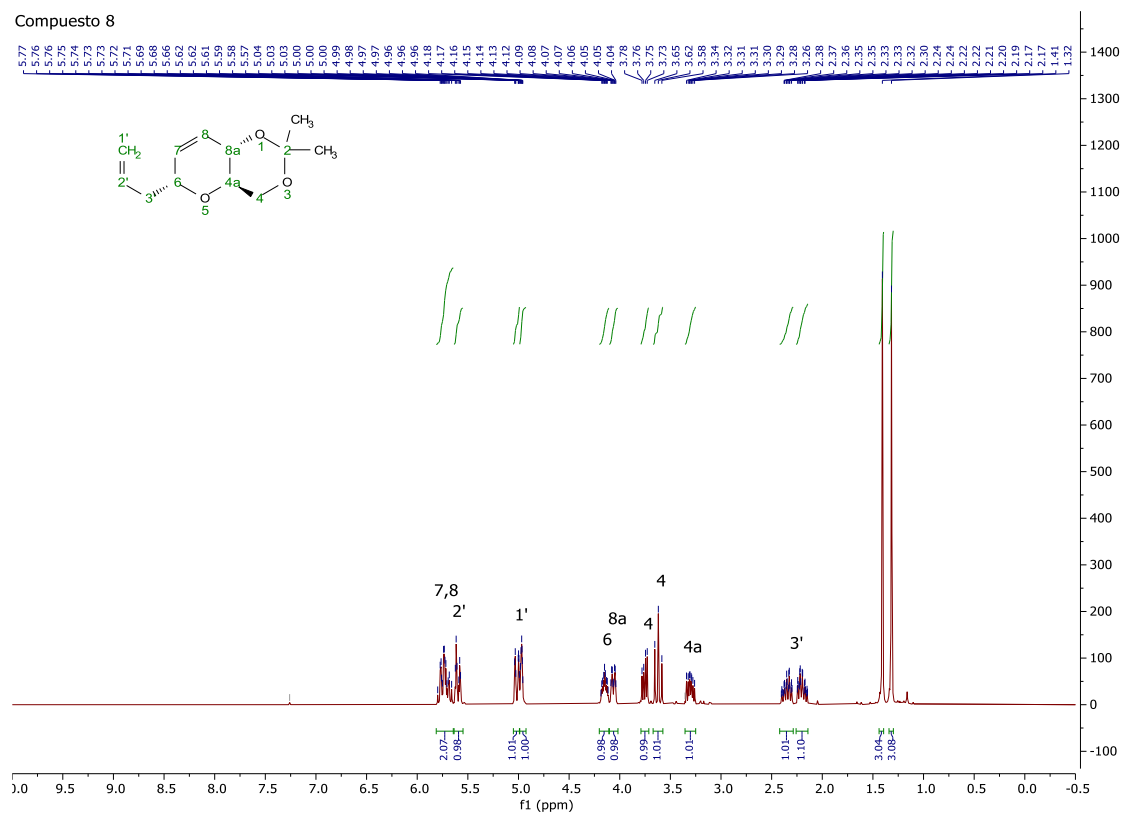


Compuesto 6

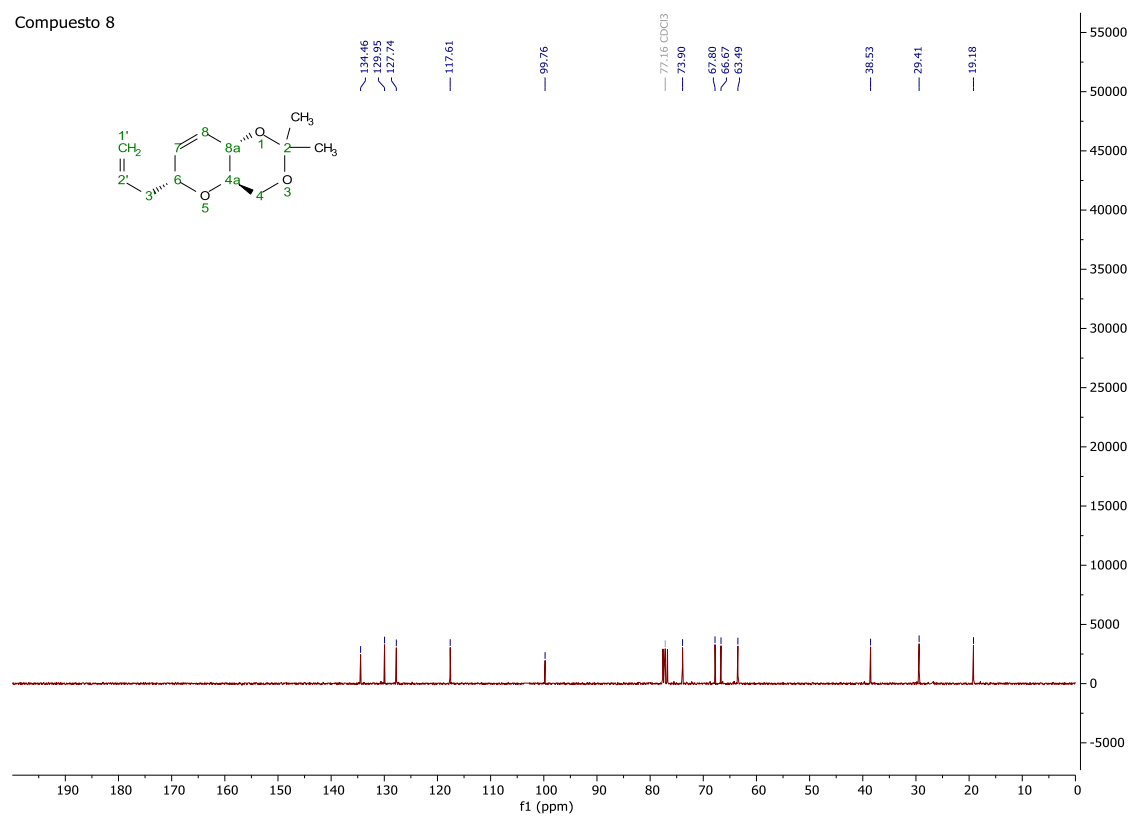


8. (4aR,6R,8aS)-6-allyl-2,2-dimetil-4,4a,6,8a-tetrahidropirano[3,2-d][1,3]dioxina (8)

Compuesto 8

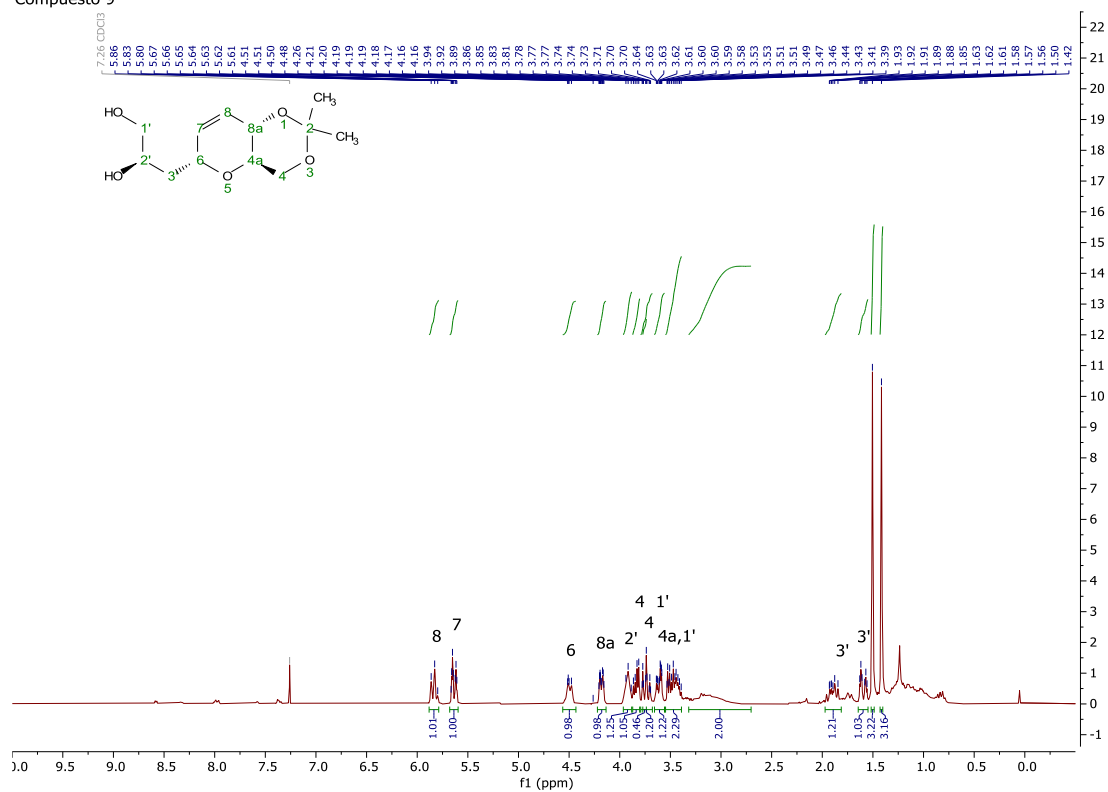


Compuesto 8

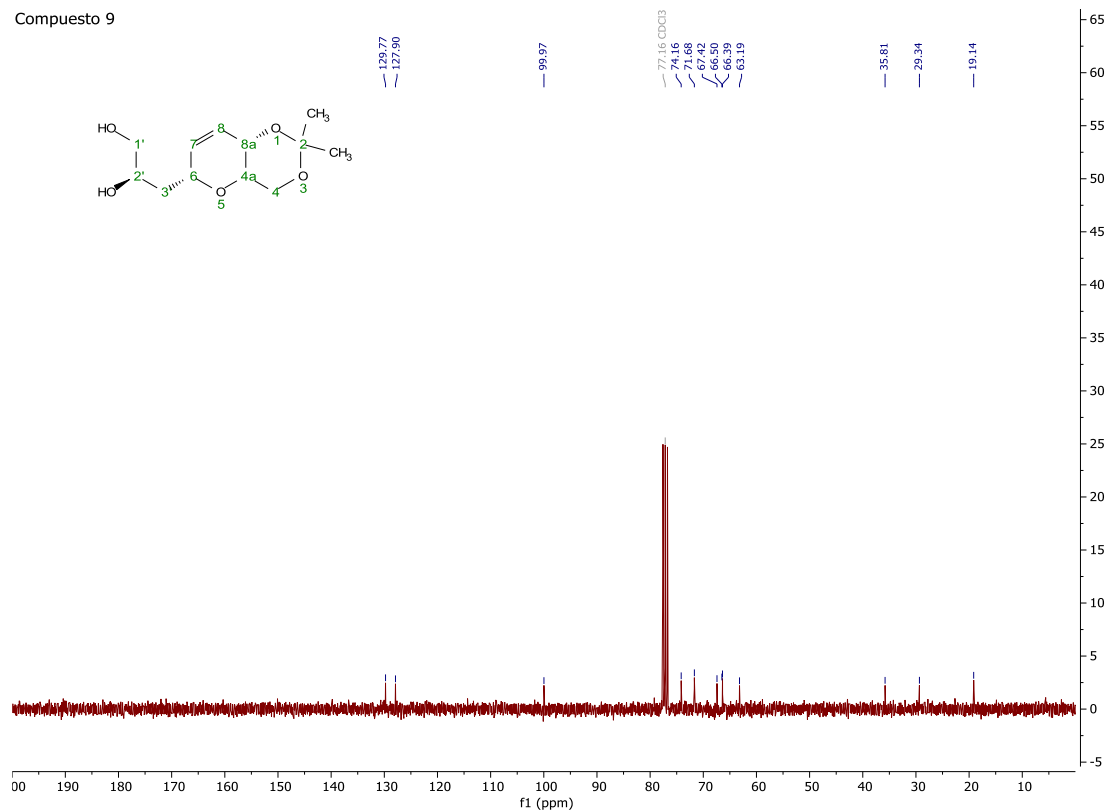


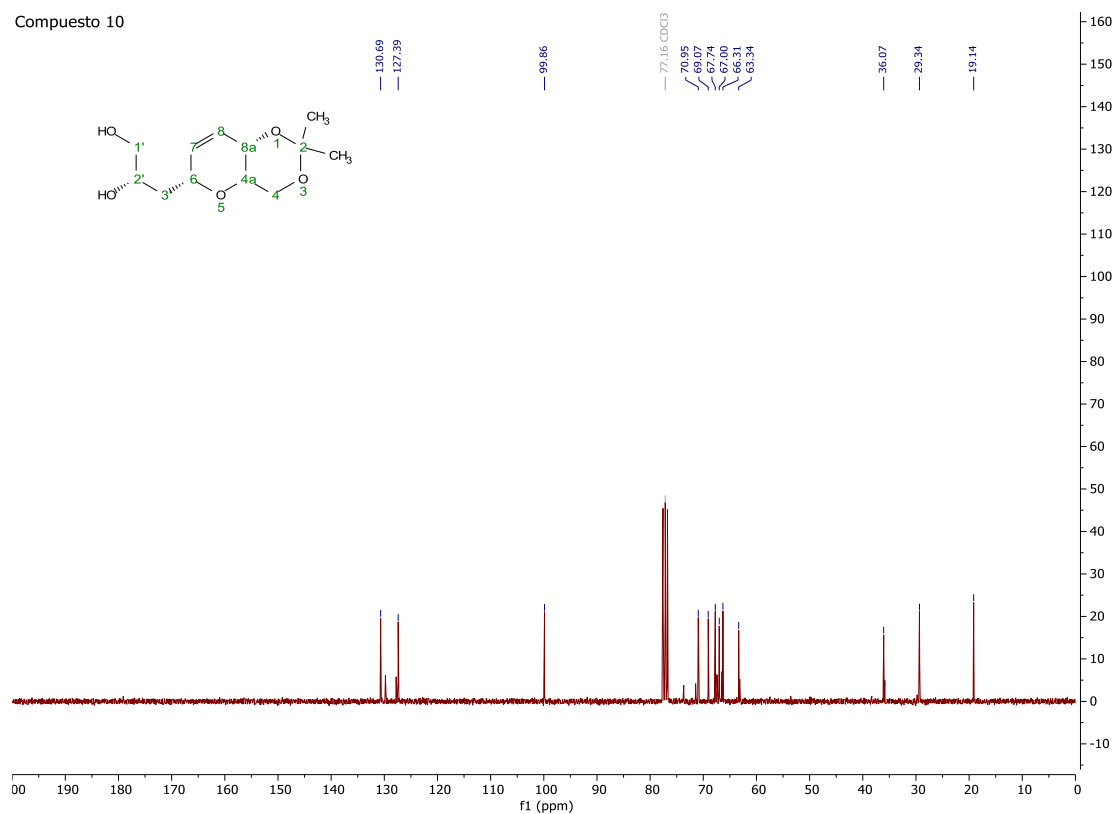
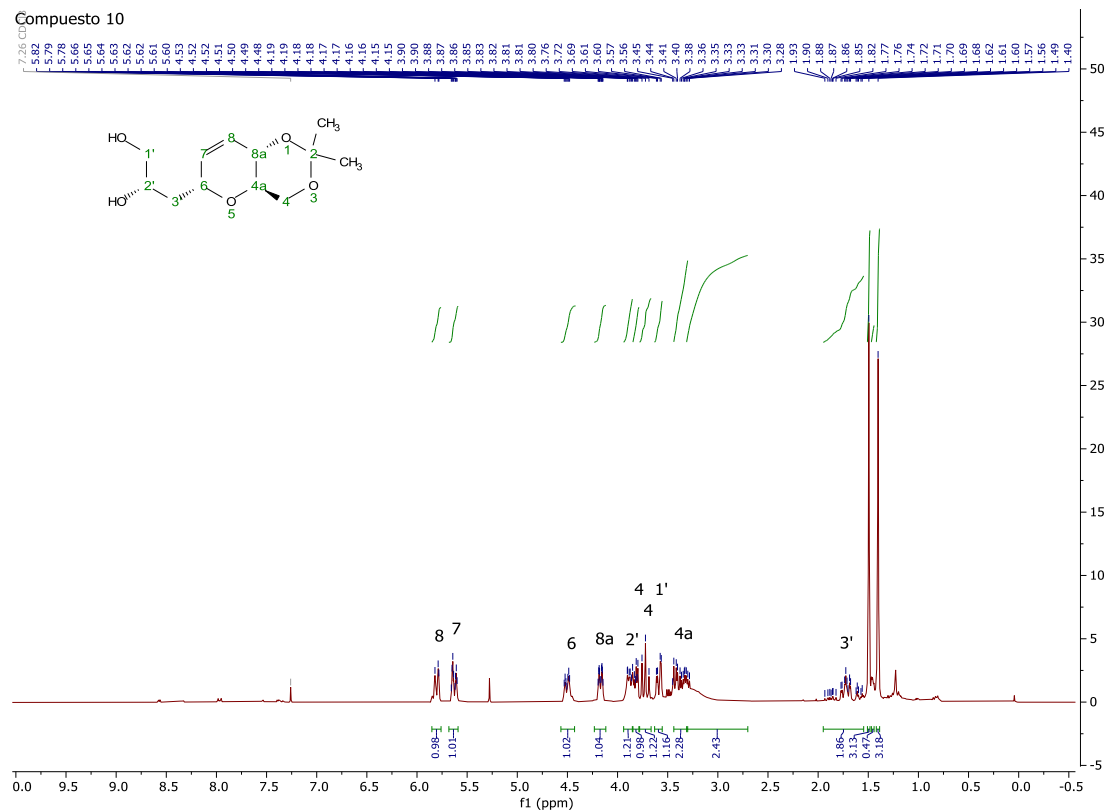
9. (2R)-3-[(4aR,6R,8aS)-2,2-dimetil-4,4a,6,8a-tetrahidropirano[3,2-d][1,3]dioxin-6-il]propano-1,2-diol (9)

Compuesto 9



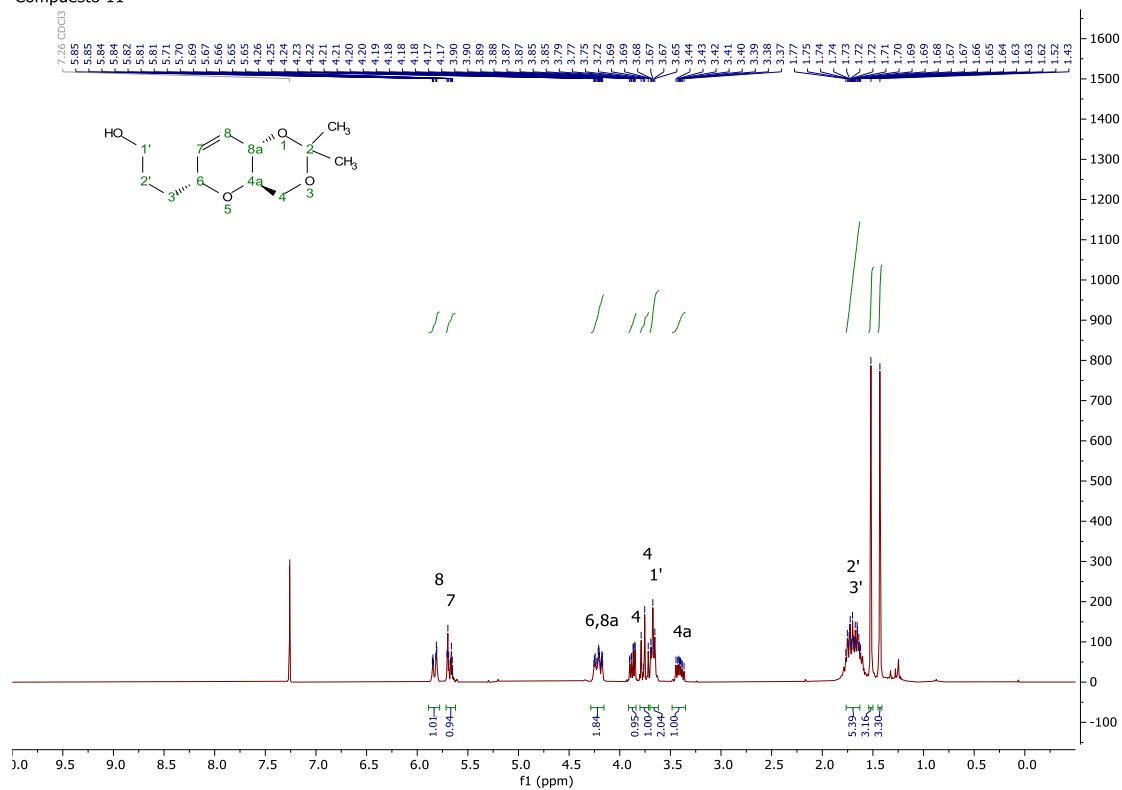
Compuesto 9



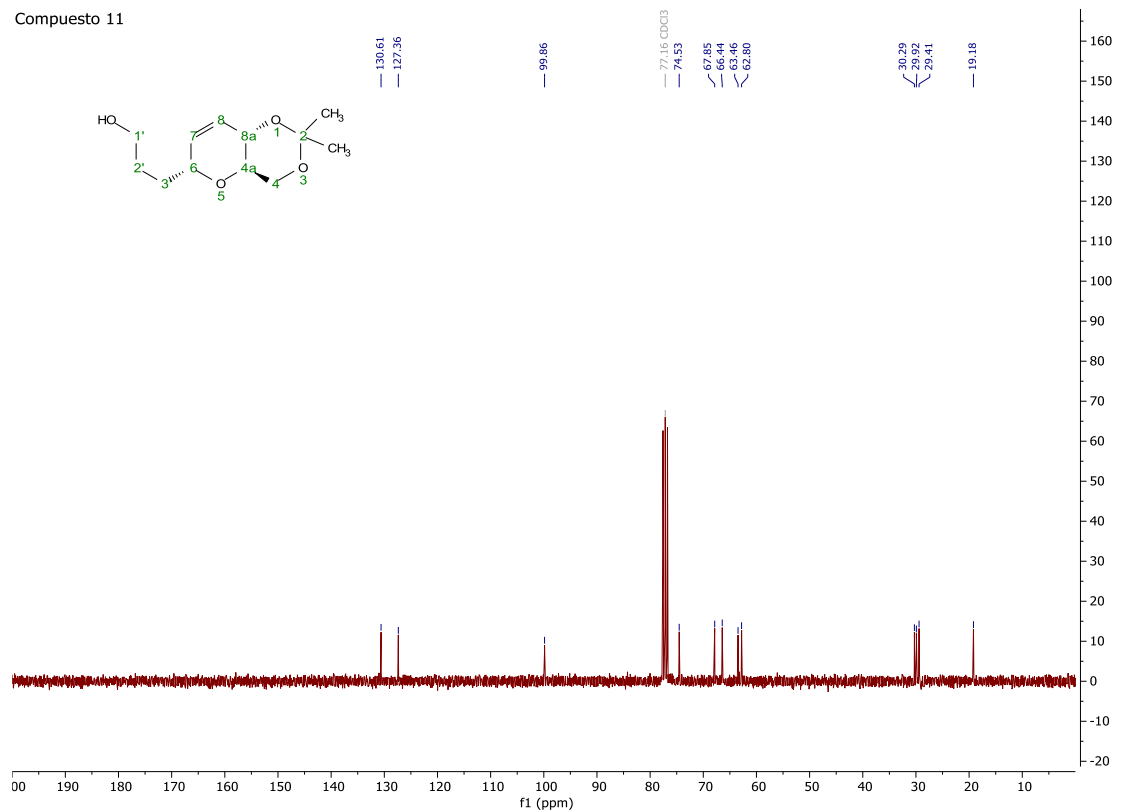
10. (2*S*)-3-[(4*aR*,6*R*,8*aS*)-2,2-dimetil-4,4*a*,6,8*a*-tetrahidropirano[3,2-*d*][1,3]dioxin-6-il]propano-1,2-diol (10)

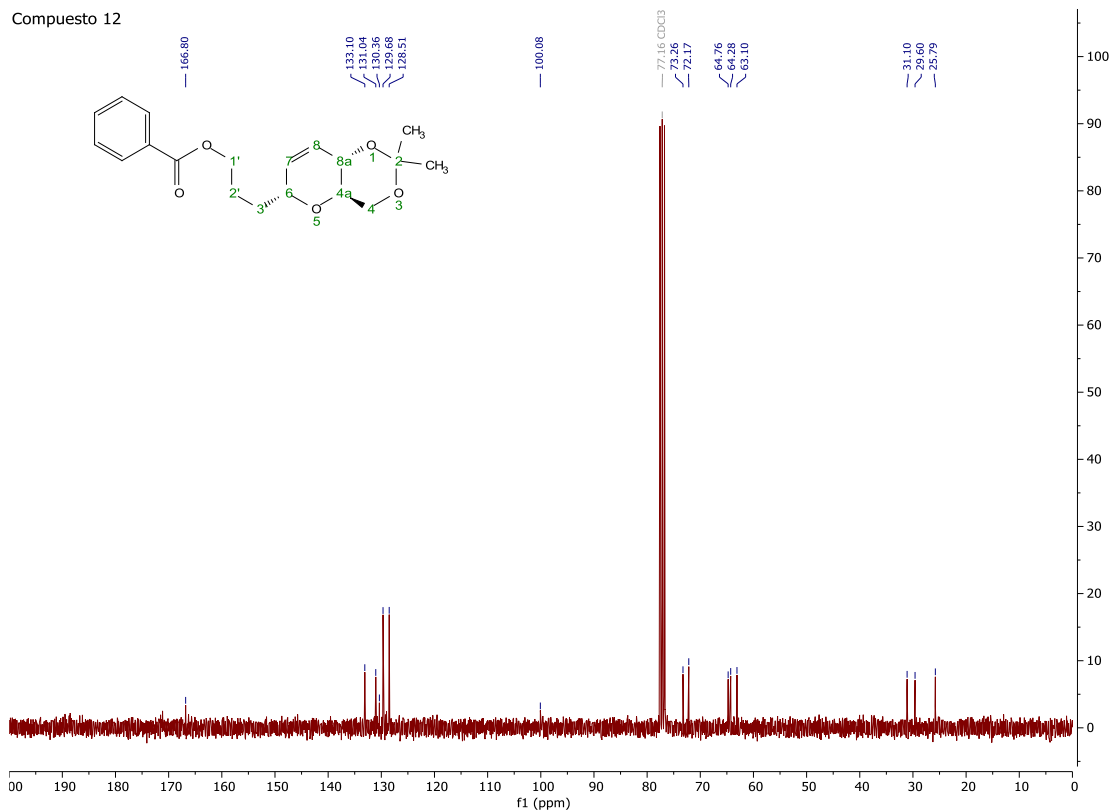
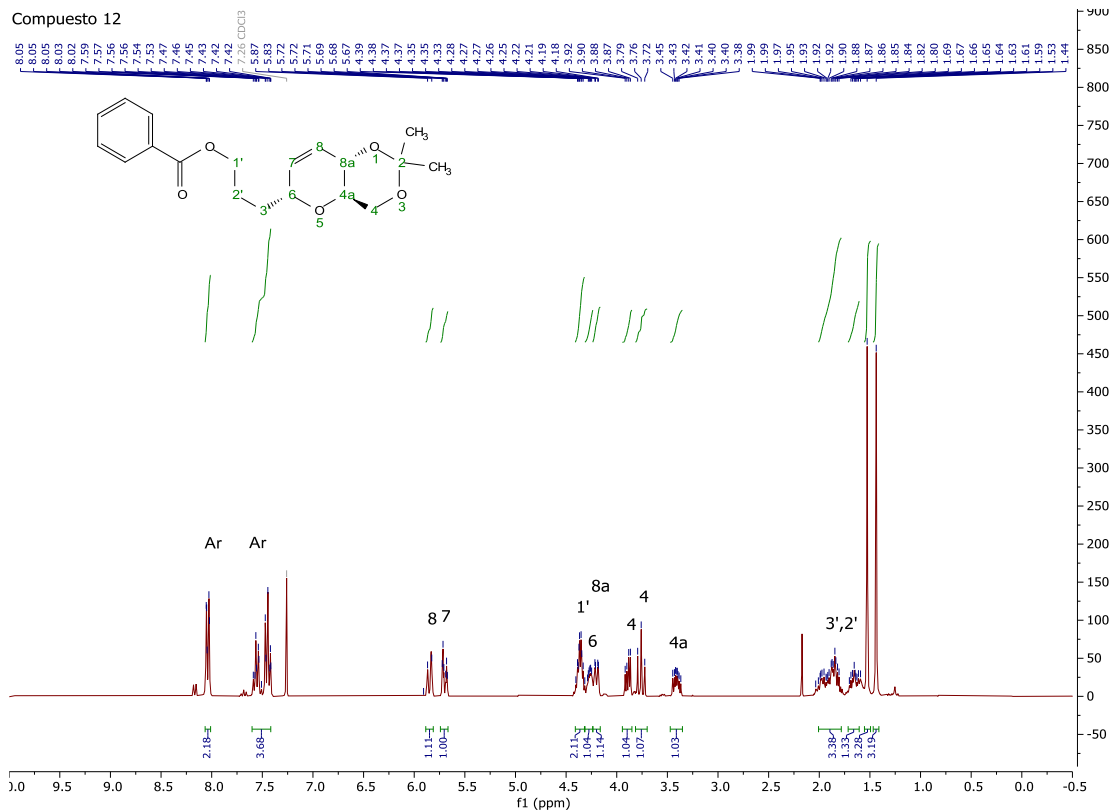
11. 3-[(4a*R*,6*R*,8a*S*)-2,2-dimetil-4,4a,6,8a-tetrahidropirano[3,2-*d*][1,3]dioxin-6-il]propan-1-ol (11)

Compuesto 11

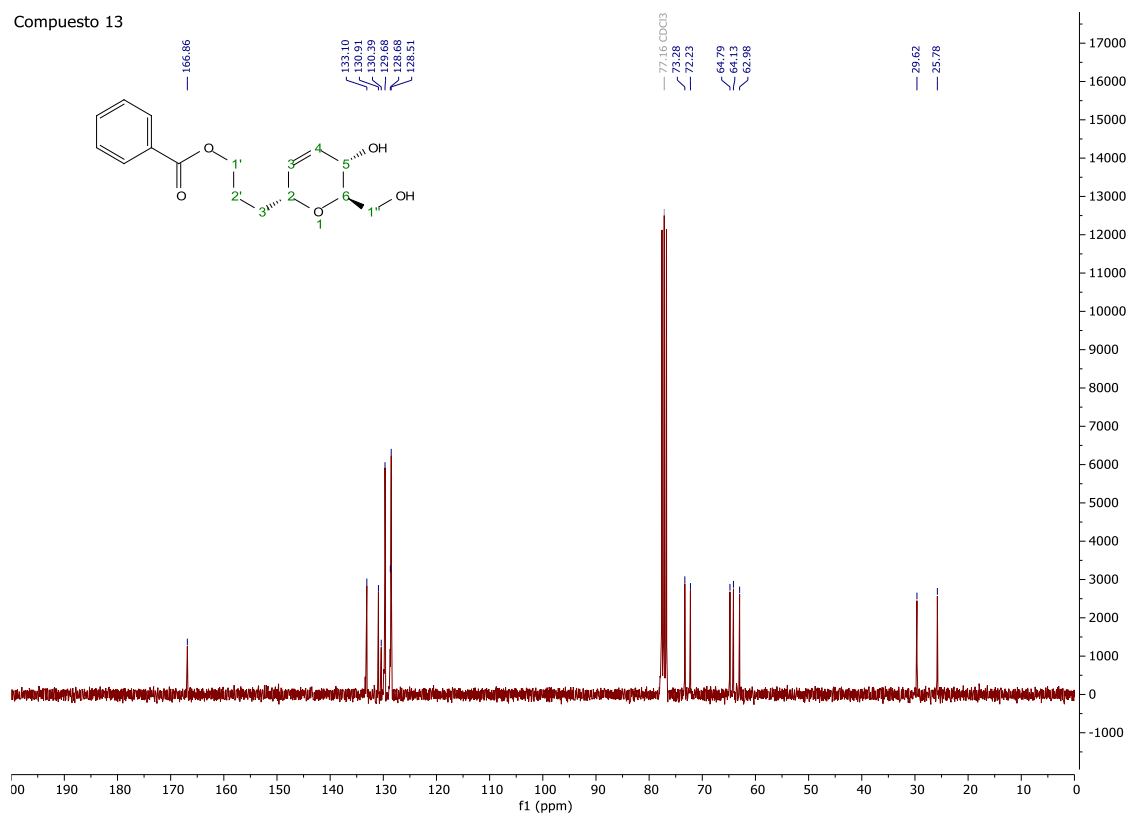
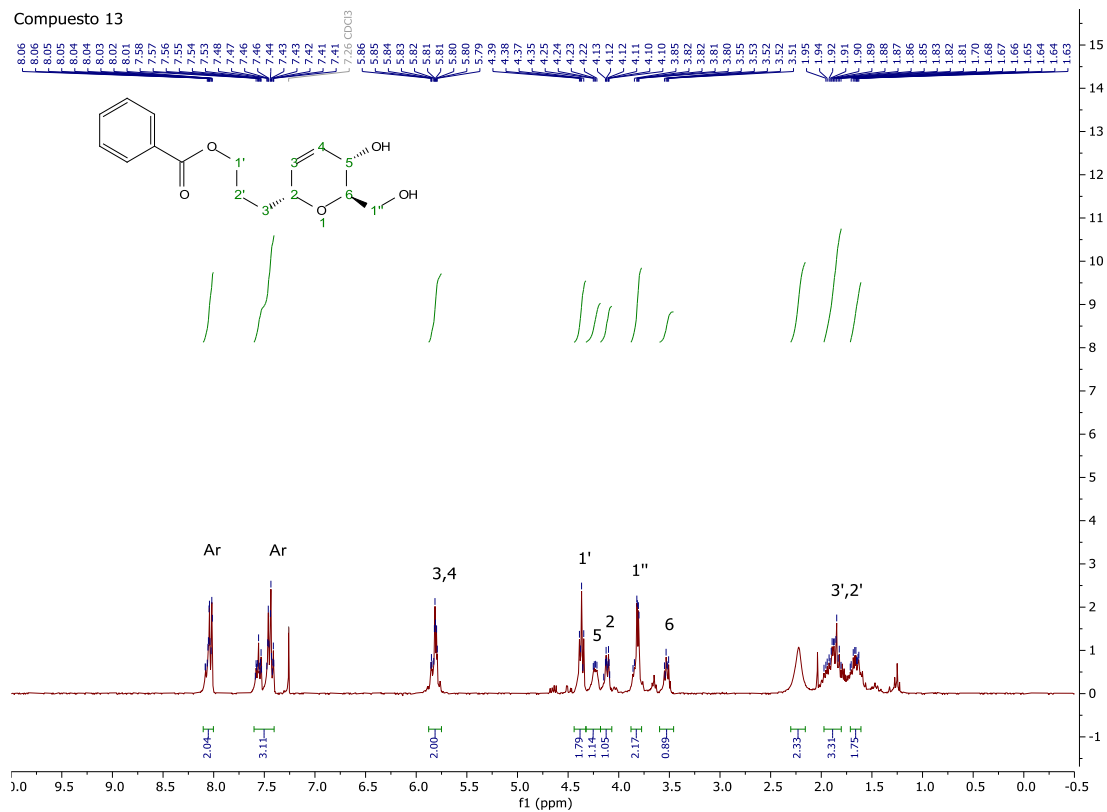


Compuesto 11



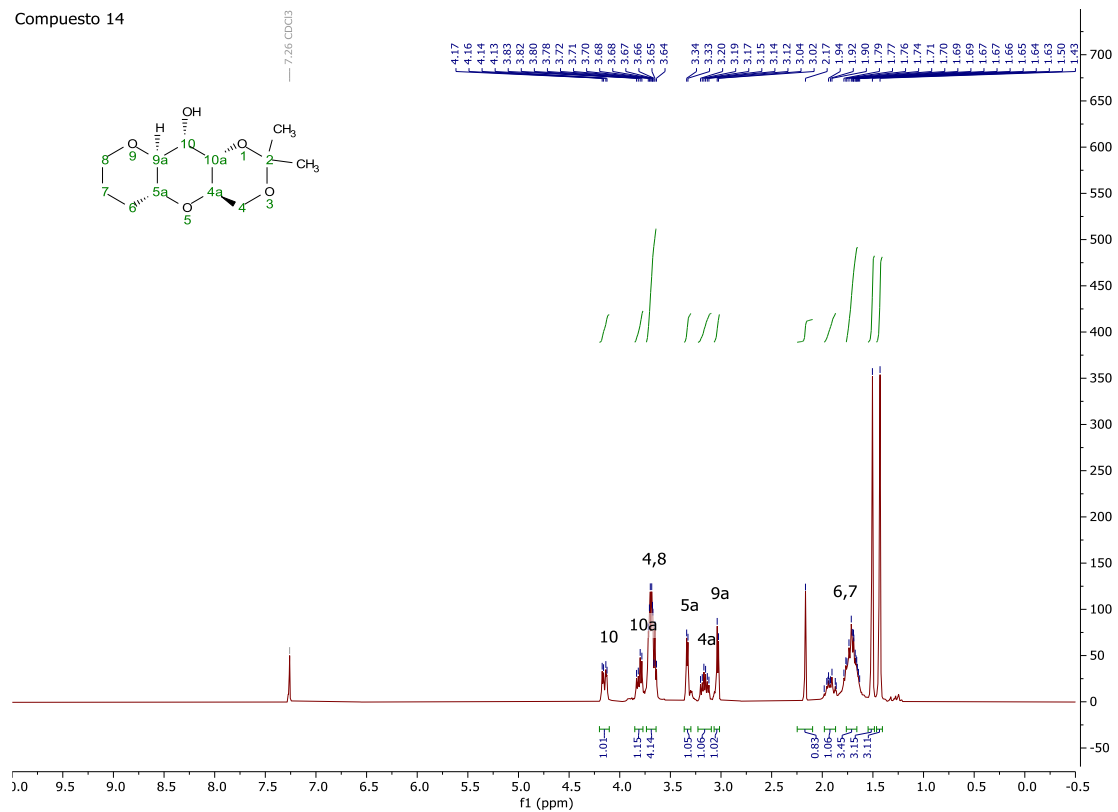
12. Benzoato de 3-[(4aR,6R,8aS)-2,2-dimetil-4,4a,6,8a-tetrahidropirano[3,2-d][1,3]dioxin-6-il]propilo (12)

13. Benzoato de 3-[(2*R*,5*S*,6*R*)-5,6-dihidro-5-hidroxi-6-(hidroximetil)-2*H*-piran-2-il]propilo (13)

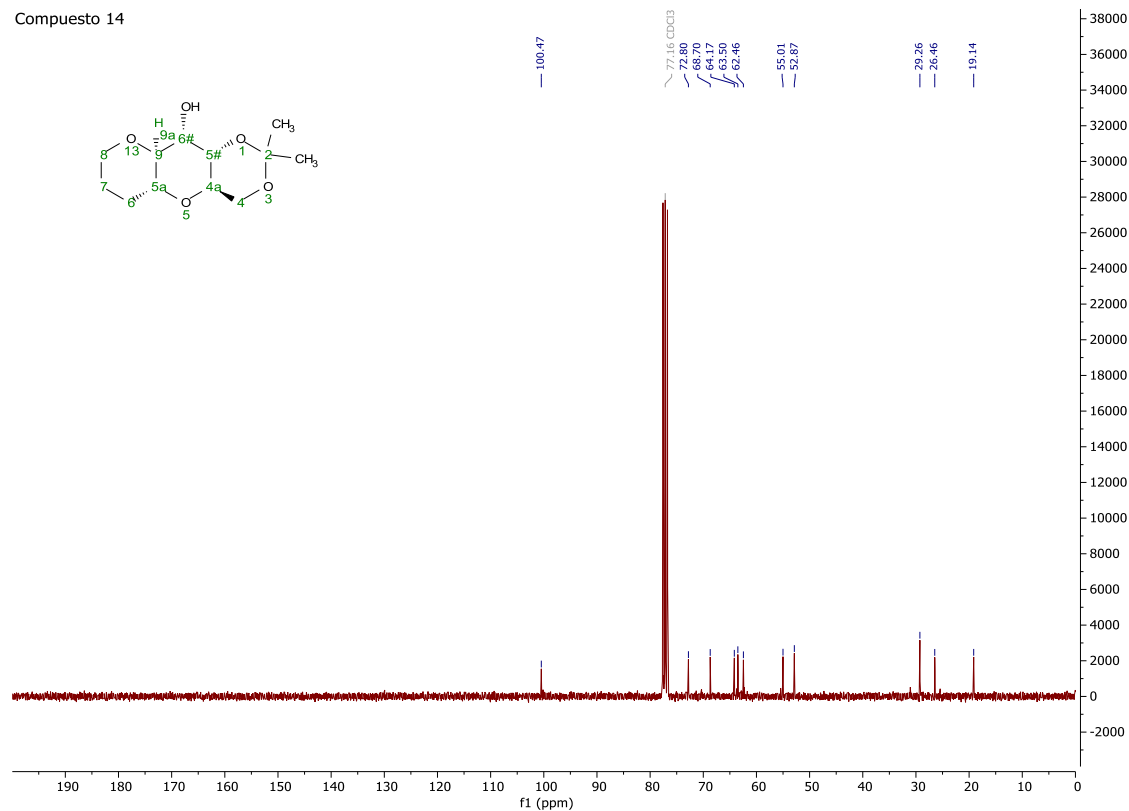


14. (4aR,5aR,9aS,10S,10aS)-2,2-dimetiloctahidro-4H-pirano[2',3':5,6]pirano[3,2-d][1,3]dioxin-10-ol (14)

Compuesto 14

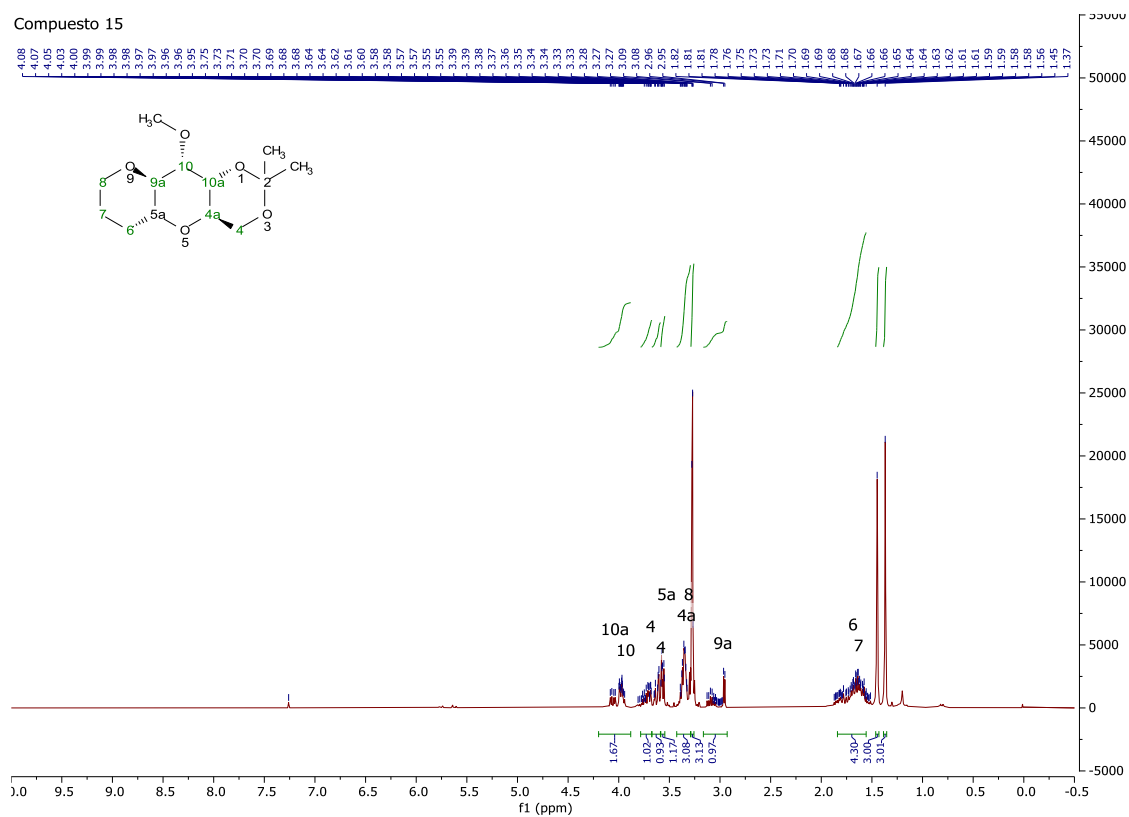


Compuesto 14

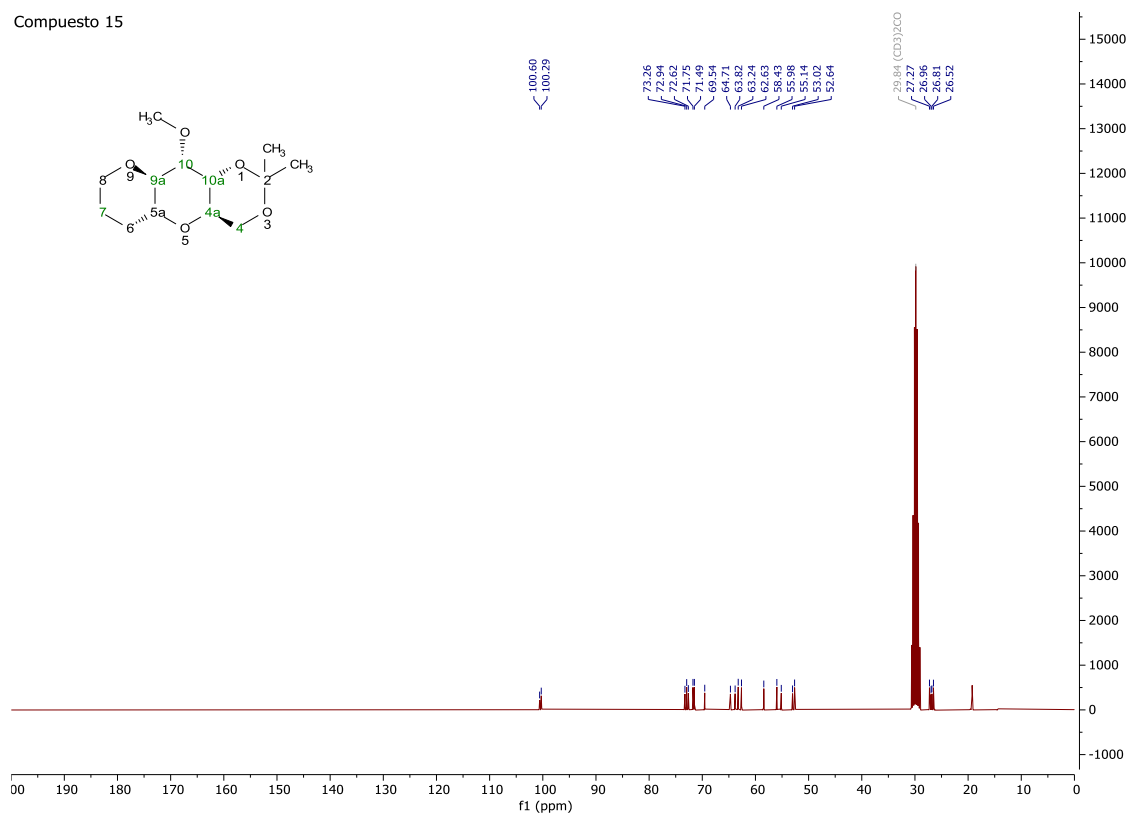


15. (4a*R*,5a*R*,10*S*,10a*R*)-2,2-dimetiloctahidro-10-metoxi-4*H*-pirano[2',3':5,6]pirano[3,2-*d*][1,3]dioxina (15)

Compuesto 15

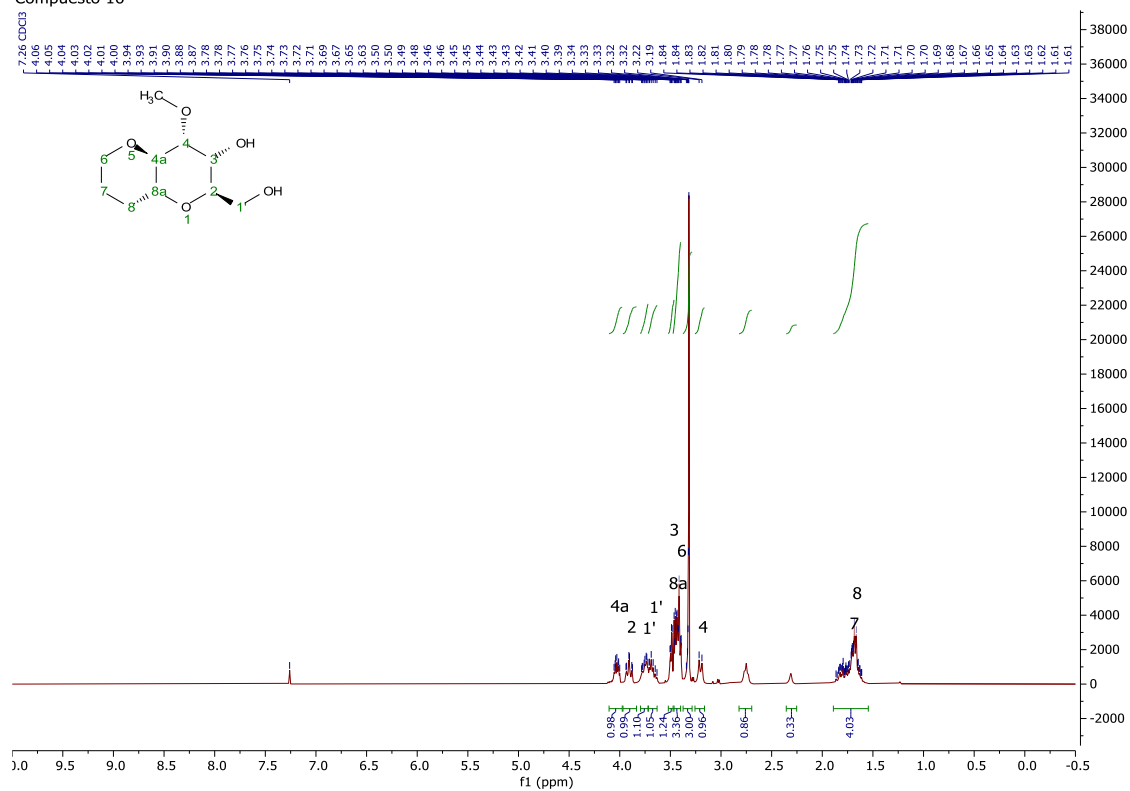


Compuesto 15

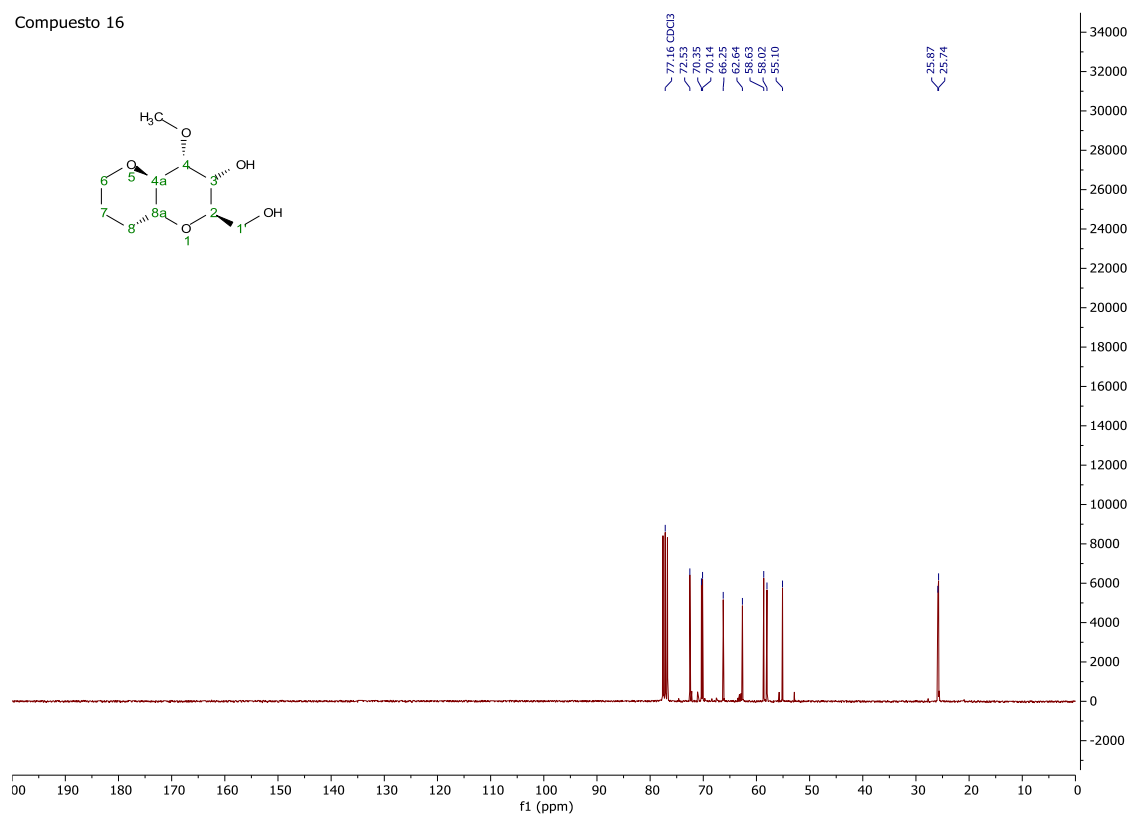


16. (2R,3R,4R,8aR)-2-(hidroximetil)-4-metoxioctahidropirano[3,2-b]piran-3-ol (16)

Compuesto 16

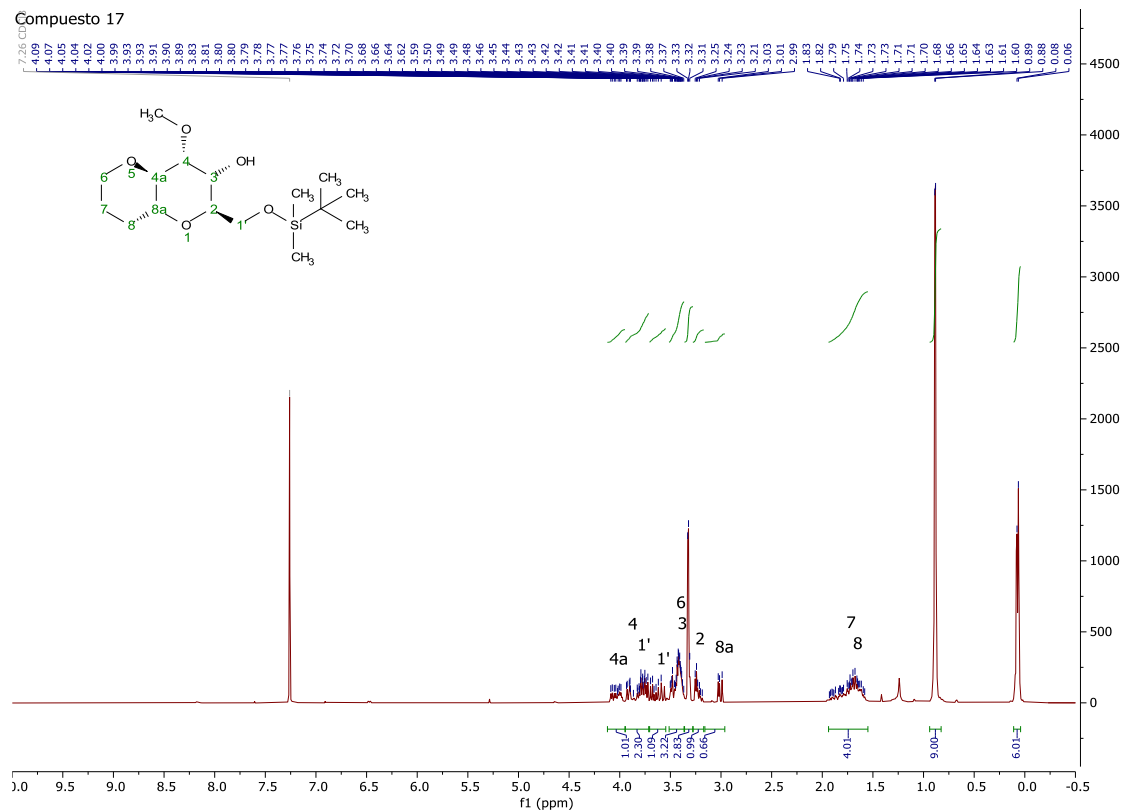


Compuesto 16

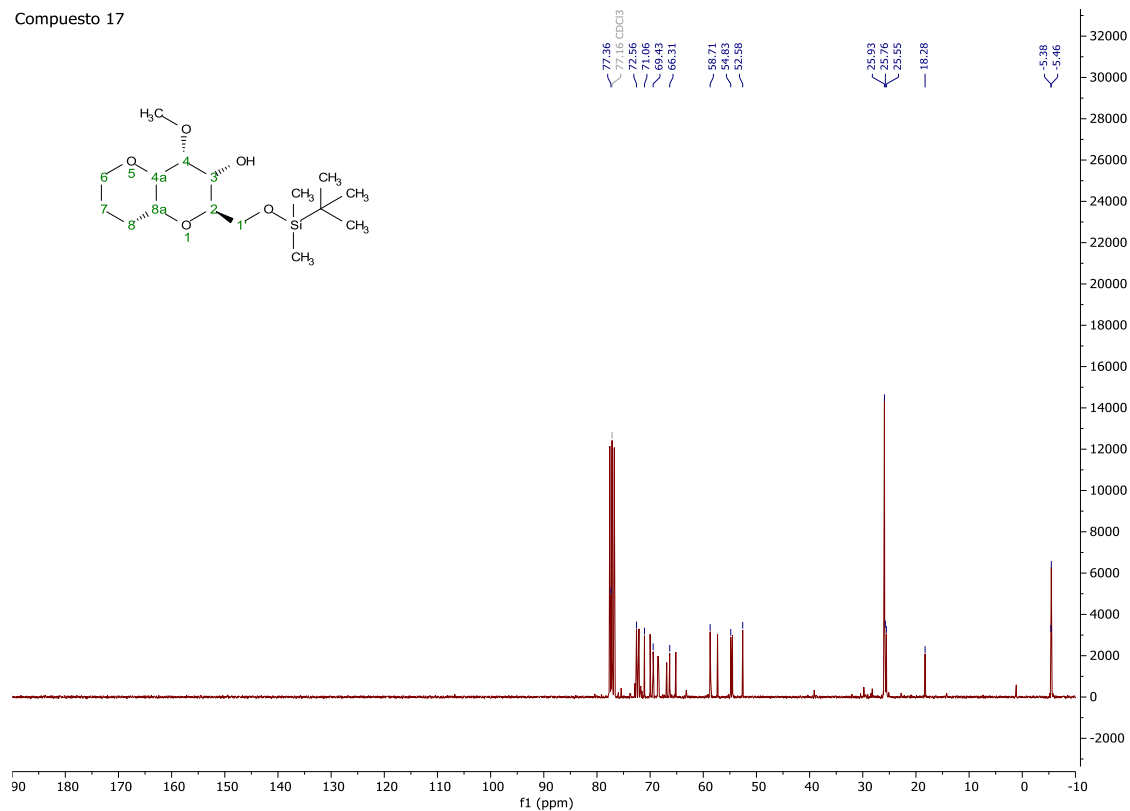


17. (2*R*,3*R*,4*R*,8*aR*)-2-[[*tert*-butildimetilsilil]oxi]metil)-4-metoxioctahidropirano[3,2-*b*]piran-3-ol (17)

Compuesto 17

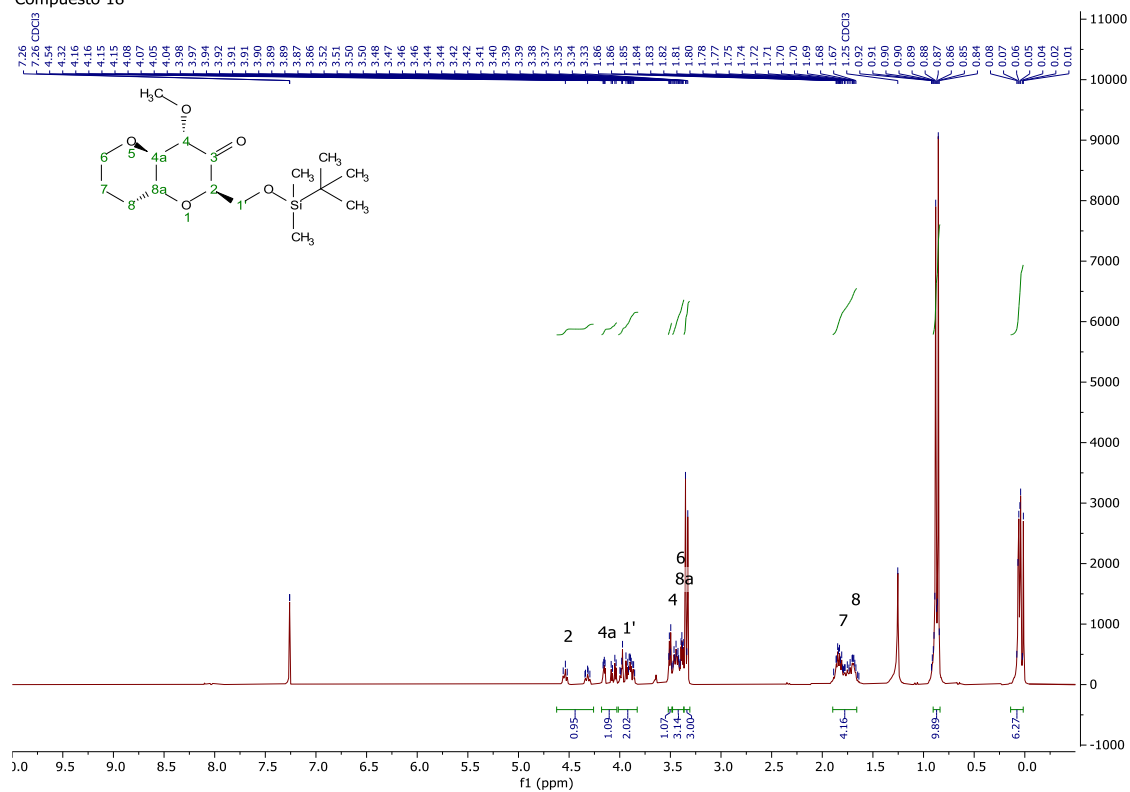


Compuesto 17

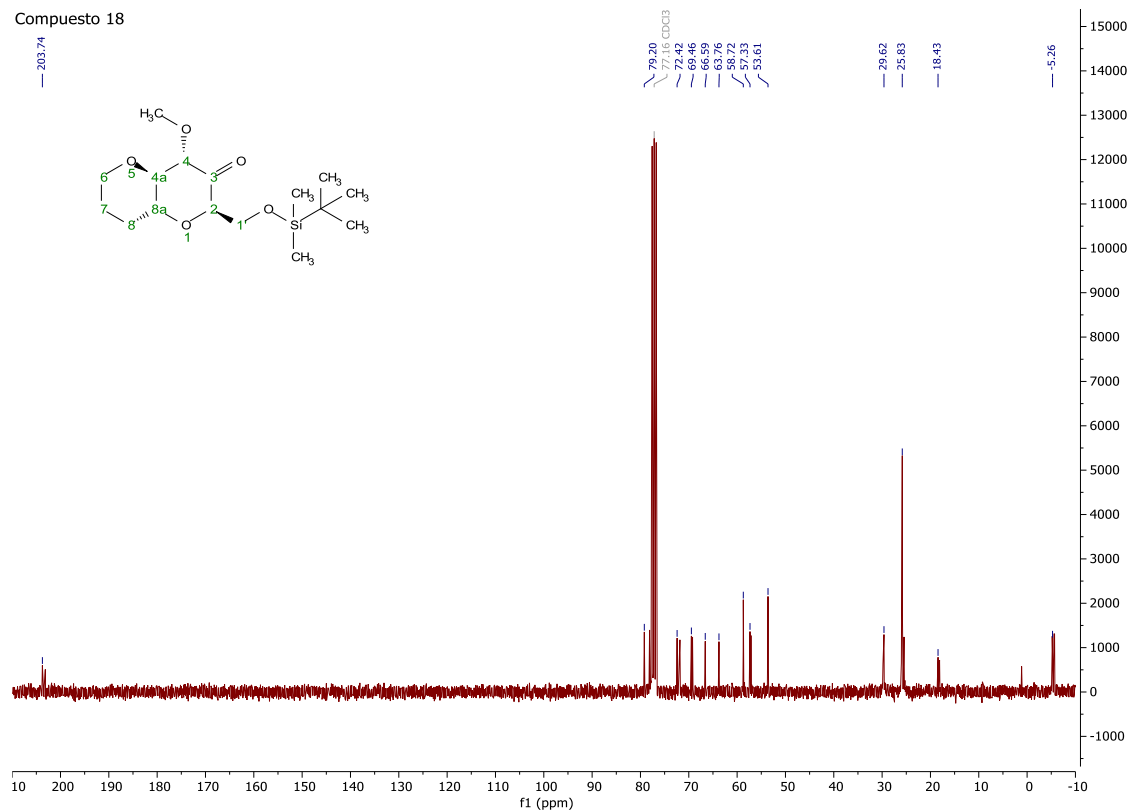


18. (2*R*,4*S*,8*aR*)-2-([(tert-butildimetilsilil)oxi]metil)-4-metoxihexahidropirano[3,2-*b*]piran-3(2*H*)-ona (18)

Compuesto 18

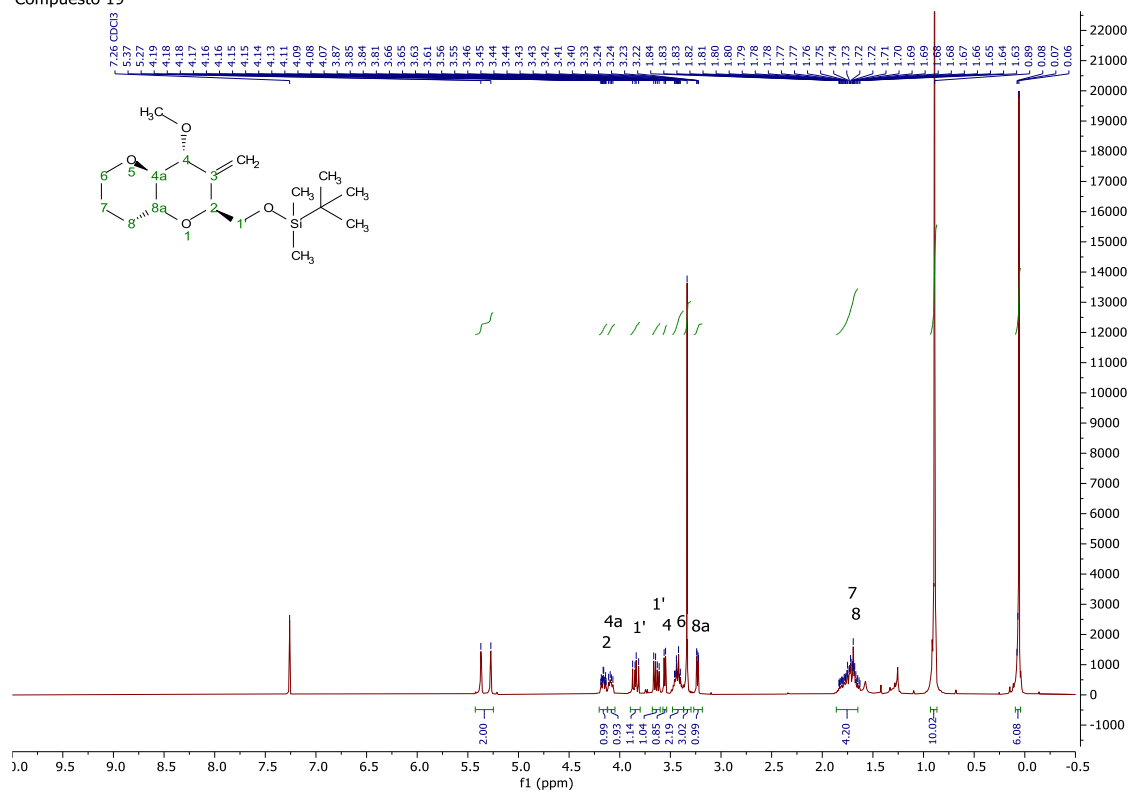


Compuesto 18

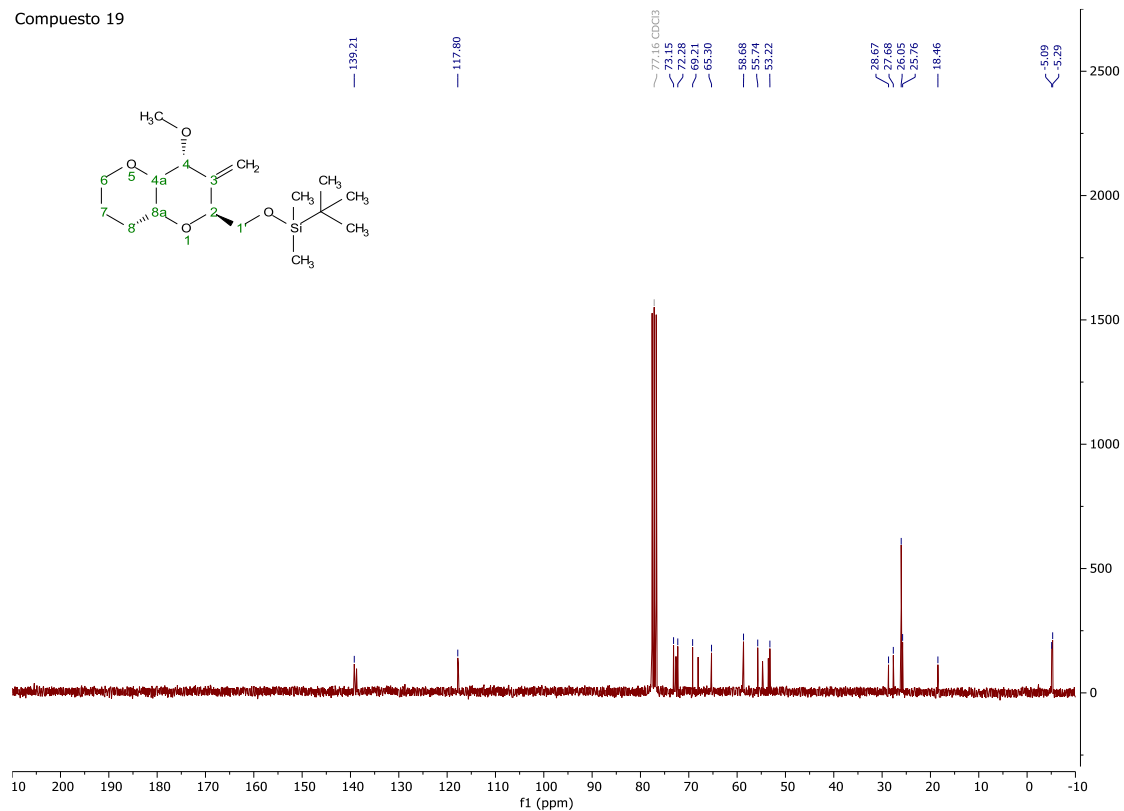


19. Tert-butil([(2*S*,4*R*,8*aR*)-3-metilen-4-metoxioctahidropirano[3,2-*b*]piran-2-il]metoxi)dimetilsilano (19)

Compuesto 19

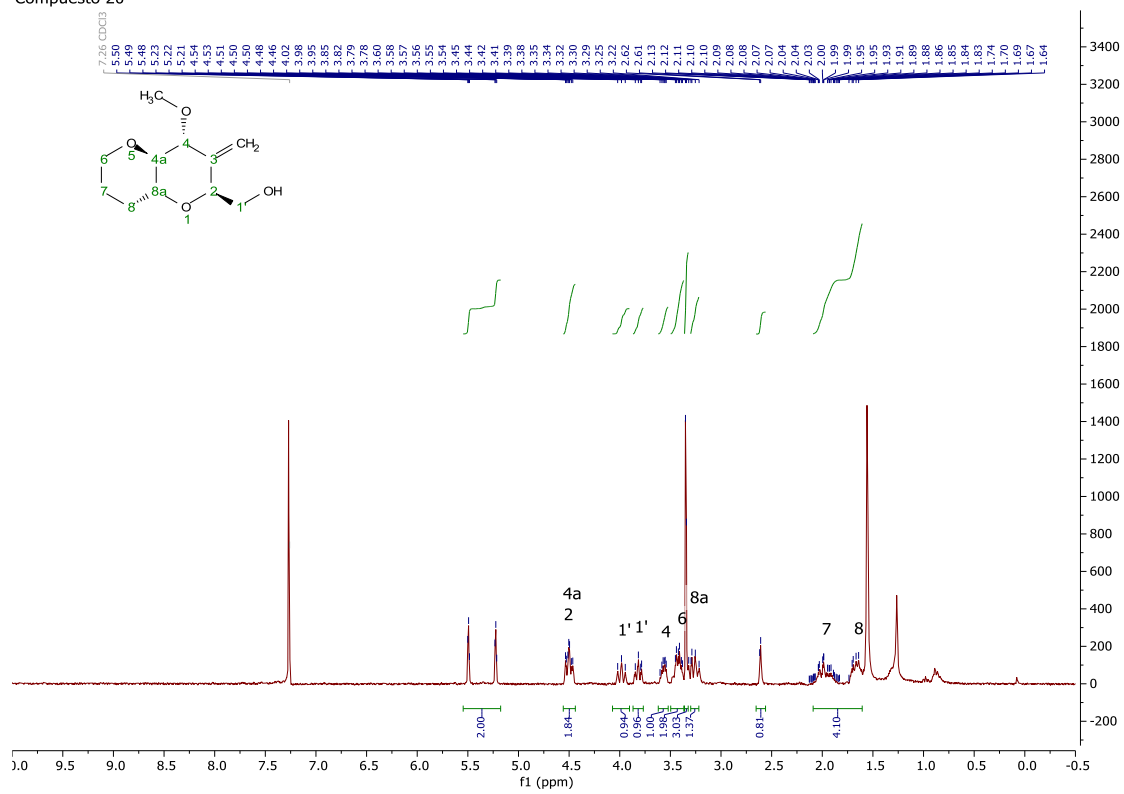


Compuesto 19



20. [(2*S*,4*R*,8*aR*)-3-metilen-4-metoxioctahidropirano[3,2-*b*]piran-2-il]metanol (20)

Compuesto 20



Compuesto 20

